

УДК 616.98

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ НОВОГО ПРЕПАРАТА «СТАФИЛОЛЕЙКИН»

Афанасьева Т.М.¹, **Мац А.Н.²**, Петровских В.П.¹, Николаева А.М.¹

¹Филиал ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед», Россия, e-mail: 89638761185@mail.ru

²ФГБУ «НИИВС им. И.И. Мечникова» РАМН, Москва, Россия

Проведены доклинические исследования специфического цитокинового препарата «Стафилолейкин», полученного по оригинальной технологии из отходов производства антистафилококкового иммуноглобулина человека. Специфическая активность препарата изучена в тесте переноса гиперчувствительности замедленного типа, регистрируемого с помощью реакции конгломерации мышинных лейкоцитов в присутствии стафилококкового белка А. Установлено, что «Стафилолейкин» индуцирует противостафилококковый клеточный иммунитет, не вызывает провоспалительной реакции и не обладает миелостимулирующим действием. При изучении острой и хронической токсичности препарата на морских свинках и белых мышах не было выявлено каких-либо признаков интоксикации у животных. Показана перспективность использования «Стафилолейкина» для лечения язвенных поражений роговицы на модели стафилококкового стромального гнойного кератита у кроликов. Доклинические испытания обосновывают возможность применения препарата «Стафилолейкин» в качестве лечебно-профилактического средства.

Ключевые слова: антигенспецифические цитокины, перенос гиперчувствительности замедленного типа к стафилококковому белку А, острая и хроническая токсичность.

PRECLINICAL RESEARCH OF THE NEW PREPARATION CALLED «STAPHYLOLEIKIN»

Afanasyeva T.M.¹, **Mats A.N.²**, Petrovskih V.P.¹, Nikolaeva A.M.¹

¹ “Biomed” – Perm Branch of the Federal State Unitary Company “Microgen” of the Ministry of Health of the Russia, e-mail: 89638761185@mail.ru

² I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Serums, Russians Academy Medical Sciences, Moscow

There has been carried out preclinical research of the specific cytokine preparation “Staphyloleikin”, obtained by the original technology from the antistaphylococcal human immunoglobulin production wastes. The preparation specific activity was studied in hypersensitivity transfer test of the delayed type, registered with the help of the reaction of conglomeration of the mice leukocytes with staphylococcal protein A presence. It has been demonstrated that “Staphyloleikin” induces anti-staphylococcal cellular immunity, does not cause pro-inflammatory reaction, and does not possesses myelopoiesis effect. While studying the preparation acute and chronic toxicity on guinea pigs and white mice no signs of toxicity in animals have been revealed. The prospects of using “Staphyloleikin” for treatment of cornea ulcers has been demonstrated on the model of staphylococcal purulent keratitis in rabbits. The preclinical research provides an appropriate opportunity of the use of “Staphyloleikin” as a means of prevention and treatment.

Keywords: antigen-specific cytokines, transfer of delayed-type hypersensitivity to staphylococcal protein A, acute and chronic toxicity.

Staphylococcus aureus вызывает гнойно-воспалительные заболевания различной локализации от легких до генерализированных форм. В настоящее время существующие методы терапии данной инфекции зачастую себя не оправдывают. Это связано с появлением устойчивости возбудителя к антибиотикам и недостаточной эффективностью общепринятой иммунотерапии с использованием иммуноглобулиновых препаратов, которые имеют ограниченный потенциал, прежде всего, в силу низкой пенетрантности полноценных антител из сосудистого русла в ткани [10]. Кроме того, эффективный противостафилококковый иммунный ответ в большей степени основан на механизмах клеточного иммунитета, чем на

функциях антител, поскольку для *S. aureus* характерно как вне-, так и внутриклеточное паразитирование [2, 9]. Отдельными наблюдениями было показано, что восстановление утраченного противостафилококкового клеточного иммунитета может быть достигнуто с помощью антигенспецифичных цитокинов [3, 4, 6, 8].

Пермским НПО «Биомед» совместно с НИИВС им. Мечникова РАМН по оригинальной технологии получен из осадка Б – отхода производства антистафилококкового иммуноглобулина человека препарат «Стафилолейкин» на основе антигенспецифичных цитокинов, представляющих собой комплекс низкомолекулярных (5 – 8 кД) белков [1].

Целью настоящего исследования является лабораторно-экспериментальная оценка эффективности и безопасности препарата «Стафилолейкин».

Материалы и методы

Экспериментально-производственные серии «Стафилолейкина» получены на базе Пермского НПО "Биомед".

Экспериментальные исследования нового препарата в системе *in vivo* выполнены на 250 белых беспородных мышах массой 18–20 г, 240 морских свинок массой 240–260 г.

За основу дизайна доклинического исследования были взяты рекомендации действующих методических документов [6, 7]. Эксперименты проведены в соответствии с этическими нормами и рекомендациями по гуманизации работы с лабораторными животными, отраженными в «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей».

Специфическую активность «Стафилолейкина» исследовали в тесте *in vivo* по переносу гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), регистрируемому в реакции зависимой агрегации лейкоцитов мышей со стафилококковым белком А (СБА). Активность «Стафилолейкина» выражали величиной дозы в мкг, или единицах активности, введение которой мышам в 100 раз снижает пороговую концентрацию СБА (D_{100}), вызывающую агрегацию циркулирующих лейкоцитов, в сравнении с эффектом введения неспецифического иммуностимулятора – натрия нуклеината. За единицу активности по аналогии с коммерческим цитокиновым препаратом «Аффинолейкин» принимали дозу, равную 50 мкг.

Миелостимулирующую активность «Стафилолейкина» (способность вызывать активацию лейкопоэза), выражающуюся увеличением степени спонтанной агрегации лейкоцитов (лейкергии), определяли на мышах одновременно с оценкой специфической активности путем дополнительного сопоставления протокольных данных о числе клеток, образующих максимальные лейкоцитарные агрегаты в «толстых каплях» крови.

Одним из необходимых показателей безопасности препарата является оценка его провоспалительной активности. Исследования проводили на мышах одновременно с оценкой специфической активности. Осматривали место инъекции препарата, подкожную клетчатку передней стенки живота и паховых областей, сосуды и лимфоузлы, расположенные под фасцией, выстилающей подкожную клетчатку изнутри, с целью выявления признаков воспаления: отек тканей, гиперемия и увеличение регионарных лимфоузлов.

Для изучения острой токсичности препарат вводили морским свинкам однократно подкожно по 0,5 мл с содержанием 14 человеческих доз (1 доза соответствует 1 единице активности) или 565 доз для морской свинки. Белым беспородным мышам «Стафилолейкин» вводили внутривенно (в хвостовую вену) 2,14 человеческих дозы – 565 доз для мыши. При изучении хронической токсичности препарат вводили в течение 20 дней внутримышечно морским свинкам по 1,4 человеческой дозы ежедневно (суммарно 1129 доз в пересчете на вес животного) и белым мышам по 0,214 человеческой дозы ежедневно (суммарно 1126 доз в пересчете на вес животного). В контрольной группе вводили в том же количестве изотонический раствор натрия хлорида. Наблюдение за животными при изучении острой токсичности вели в течение 14 суток, при хронической – в течение 34 суток. Ежедневно регистрировали следующие показатели: гибель животных, их вес, наличие или отсутствие клинических симптомов интоксикации.

Через 24 часа, 7 суток и 14 суток после введения препарата в опытах острой и хронической токсичности по 10 морских свинок (5 самцов и 5 самок) и 10 белых беспородных мышей (5 самцов и 5 самок) из опытной и контрольной групп подвергали эвтаназии. Патоморфологическое изучение включало макроскопическое и гистологическое исследование внутренних органов. Для проведения гистологических исследований фиксировали следующие органы: головной мозг, сердце, печень, селезенка, почки, надпочечники, тимус, лимфатические узлы (паховый, брыжеечный).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием методов описательной статистики. Для оценки значимости межгрупповых различий использовали парный и непарный t-критерий Стьюдента, различия или показатели связи считались значимыми при $p < 0,05$, а также медианы и 95 %-е доверительные интервалы. В работе использовали пакеты статистических программ MS Excel, «DIASTA» (МГУ, Россия).

Результаты

В сравнительных исследованиях установлено, что «Стафилолейкин» индуцирует более выраженный клеточный иммунитет, чем коммерческий полиспецифичный «Аффинолейкин» (таб. 1).

Таблица 1

Результаты определения D_{100} «Стафилолейкина» и «Аффинолейкина» в реакции конгломерации мышинных лейкоцитов с СБА, по сравнению с нуклеинатом натрия

D_{100} «Стафилолейкин» мкг/мышь	D_{100} «Аффинолейкин» мкг/мышь
6 (4 ÷ 32)*	12 (2 ÷ 16)*

*Медиана и 95 % доверительный интервал по Ван дер Вардену.

В ходе исследования специфической активности также было установлено, что «Стафилолейкин» не вызывает провоспалительной реакции и не обладает миелостимулирующим действием.

Одним из важнейших этапов лабораторно-экспериментальных исследований нового препарата является изучение острой и хронической токсичности. Было установлено, что введение «Стафилолейкина» не вызвало падения массы тела животных и не тормозило её физиологическое увеличение с возрастом. Ни одно животное не погибло, и не было замечено каких-либо симптомов интоксикации. Более того, ежедневное введение препарата Стафилолейкин в течение 20 дней не только не привело к замедлению физиологического нарастания веса животных, но и в группе самок вызвало тенденцию к ускорению привеса в последнюю неделю наблюдения. При вскрытии через сутки после введения препарата внутренние органы мышей и морских свинок визуально были обычного цвета (что свидетельствовало о нормальном кровенаполнении) и эластичной консистенции. Поверхность печени, почек и селезёнки была гладкой. При осмотре брюшной полости и брыжейки не было замечено петехиальных кровоизлияний. Гистологическое исследование лёгких морских свинок, использованных в опытах острой токсичности, выявило незначительное полнокровие и очаговые утолщения межальвеолярных перегородок со слабо выраженной полинуклеарной инфильтрацией. В селезёнке отмечено умеренное полнокровие красной пульпы и увеличение числа мегакариоцитов. В тимусе, сердце, печени и почках, а также в месте введения препарата каких-либо патологических изменений не обнаружено.

При вскрытии в поздние сроки органы животных выглядели нормально. Отмеченные ранее изменения на срезах лёгких и селезёнки морских свинок не наблюдались. В тимусе, сердце, печени, почках и в месте введения препарата каких-либо патологических изменений также не выявлено.

В опытах моделирования стафилококкового гнойного кератита на кроликах после развития одинаково выраженного в опытной и контрольных группах воспаления с образованием инфильтрата в строме роговицы в опытной группе в конъюнктивальный мешок ежедневно инстиллировали «Стафилолейкин», а в контрольной – изотонический раствор натрия хлорида. Было установлено, что «Стафилолейкин» на неделю, по сравнению с

контролем, ускорял заживление стафилококкового гнойного кератита при значимом различии балльных оценок.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что «Стафилолейкин» индуцирует противостафилококковый клеточный иммунитет, не проявляет ни острой, ни хронической токсичности, не вызывает провоспалительной и миелостимулирующей реакции, способствует излечению стафилококкового гнойного кератита у кроликов. Результаты доклинических исследований можно рассматривать как предпосылку для клинических испытаний нового препарата при иммунотерапии хронической, устойчивой к антибиотикам, очаговой и септической стафилококковой инфекции.

Список литературы

1. Афанасьева Т.М. Технология получения препарата «Стафилолейкин» из осадка «Б» – отхода производства антистафилококкового донорского иммуноглобулина / Т.М. Афанасьева, В.П. Петровских, А.М. Николаева, А.В. Казьянин, А.Н. Мац // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – 2012. – Т. 8, №1. – С. 27-32.
2. Бухвальд З. Местный специфический иммунный ответ на белок А *Staphylococcus aureus* в лимфоидной ткани миндалин человека / З. Бухвальд, Н.П. Перепечкина, В.Ф. Салов, А.Н. Мац // Журн. микробиол. – 1985. – № 5. – С. 78.
3. Мац А.Н. Концепция низкомолекулярных антигенспецифичных цитокинов и её новые практические приложения / А.Н. Мац, М.Н. Боков, М.Н. Кузьмина // Аллергология и иммунология. – 2008. – Т. 9, № 4. – С. 444–447.
4. Мац А.Н. «Трансфер-фактор» – это N-концевая часть «протомера» растворимого Т-клеточного антигенсвязывающего белка // Аллергология и иммунология. – 2005. – Т. 6, № 2. – С. 140–143.
5. Мокроносова М. А. *Staphylococcus aureus* в патогенезе атопического дерматита : сб. тр. межд. симп. / Аллерговакцинация: новые стратегии и перспективы». 24–27 ноября 2002. – Сочи, 2002. – С.72-80.
6. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармацевтических веществ Минздрава РФ / под общей редакцией чл.-корр. РАМН, профессора Р.У. Хабриева. – М., 2005. – 832 с.
7. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Иммунобиологические лекарственные препараты). Ч. 2. – М.: Гриф и К, 2012. – 536 с.

8. Borkowsky W. Deletion of antigen-specific activity from leukocyte dialysates containing transfer factor by antigen-coated polystyrene / W. Borkowsky, H.S. Lawrence // J. Immunol. – 1981. – Vol. 126, No. 2. – P. 486–489.
9. Brummer E, Foster LG, Bhardwaj N, Lawrence H – In: Immunoregulators in transfer factor. – N.Y., 1979. – P. 27–39.
10. Watkins R.R., David M.Z., Salata R.A. Current concepts on the virulence mechanisms of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* / R.R. Watkins, M.Z. David, R.A. Salata // J. Med. Microbiol. – 2012. – Vol. 61. – P. 1179-1193.

Рецензенты:

Фельдблюм И.В., д.м.н., профессор, заведующая кафедрой эпидемиологии с курсом гигиены и эпидемиологии ФДПО, ГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера», г. Пермь;

Маслов Ю.Н., д.м.н., профессор кафедры микробиологии и вирусологии, ГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера», г. Пермь.