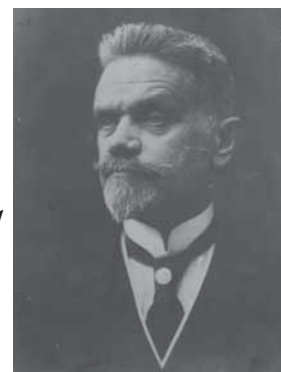


БИО ПРЕПАРАТЫ

№ 3 (43)
Июль–Сентябрь 2011



Л.А. Тарасевич

ПРОФИЛАКТИКА • ДИАГНОСТИКА • ЛЕЧЕНИЕ

Журнал зарегистрирован

в Комитете РФ по печати

ПИ № ФС77-26255 от 24.11.2006 г.

Учредители журнала «БИОпрепараты»:

ООО «Центр иммунопрофилактики МЕДЭП»
и «Гелла-Принт»

Журнал напечатан в типографии

РПО «Гелла-Принт»

Выпускающий редактор

Гольман И.А.

Редактор

Гольман Э.И.

Научный редактор:

Лебединская Е.В.

Члены редколлегии:

Аллилуев А.П.

Балаболкин И.И.

Воробьева М.С.

Горбунов М.А.

Гущин И.С.

Красильников И.В.

Мовсесянц А.А.

Озерецковский Н.А.

Чешик С.Г.

Чупринина Р.П.

Ярилин А.А.

Редакционный совет:

Игнатьев Г.М. (Беларусь)

Кашкин К.П. (Москва)

Львов Д.К. (Москва)

Покровский В.И. (Москва)

Учайкин В.Ф. (Москва)

Хаитов Р.М. (Москва)

Чернушенко Е.Ф. (Украина)

Дизайн: Смирягин Д.С.

Верстка: Ежков А.С.

Подписано в печать: 14.09.2011

Адрес редакции: ФГБУ "ГИСК им. Л.А.
Тарасевича" Минздравсоцразвития РФ,
119002, Москва, пер. Сивцев Вражек, 41.

Тираж 3000 экз.

Издательская лицензия:

ИД № 04065 от 23.02.2002 г.

Лицензия на полиграфическую деятельность:

Плр № 060395 от 05.07.1999 г.



БИОпрепараты ПРОФИЛАКТИКА•ДИАГНОСТИКА•ЛЕЧЕНИЕ

Рецензируемый научно-практический журнал Государственного научно-исследовательского института стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов имени Л.А. Тарасевича

BIOPreparats PREVENTION•DIAGNOSIS•TREATMENT

Scientific and practical journal of the Federal State Budgetary Institution «Tarasevich State Research Institute of Standardization and Control of Biological Medicines», Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation

Главный редактор

доктор медицинских наук, профессор Борисевич И.В.

Editor-in-Chief

MD Professor Borisevich I.V.

Заместитель главного редактора

академик РАН Медуницын Н.В.

Deputy Editor-in-Chief

Academician The Russian Academy of Sciences MD Medunitsyn N.V.

Ответственный секретарь редакции

кандидат биологических наук Супотницкий М.В.

Executive secretary of the editorial board

PhD Supotnitskiy M.V.

Контакты редакции

тел.: +7 (499) 241 89 43

e-mail: info@gisk.ru

Contact information

tel.: +7 (499) 241 89 43


e-mail: info@gisk.ru

ISSN 2221-996X

on-line версия журнала www.biopreparaty-magazine.ru

Содержание


Хроника Chronicle

-  **Николай Васильевич Медуницын (к 80-летию со дня рождения)** 4
Nikolay Vasilievich Medunitsyn (to the 80-th Anniversary)
Владимир Федорович Попов (к 80-летию со дня рождения) 5
Vladimir Fedorovich Popov (to the 80-th Anniversary)





Редакционная статья Editorial

-  **Прощай, ГИСК ...** 6
Борисевич И.В., Супотницкий М.В.
Farewell to Tarasevich State Control Institute
Borisevich I.V., Supotnitskiy M.V.


Обзор Review

-  **Генотерапевтические векторные системы на основе вирусов** 15
Супотницкий М.В.
Genotherapeutic Vector Systems Based on Viruses
Supotnitskiy M.V.

Обмен опытом Exchange of Experience between Specialists

-  **Использование дрожжевого рекомбинантного интерлейкина-2 (Ронколейкин) в экстренной профилактике послеоперационных инфекционных осложнений у пациентов с сахарным диабетом 2 типа** 27
Зубрицкий В.Ф., Брюсов П.Г., Фоминых Е.М., Низовой А.В., Кулезнёв Р.А., Исламов Р.Н., Самойлов О.А.
Using the Yeast Recombinant Human Interleukin-2 (Roncoleukin) in Emergency Prophylaxis of Postoperative Infectious Complications in Patients with Type 2 Diabetes
Zubritsky V.F., Brusov P.G., Fominykh E.M., Nizovoi A.V., Kyleznev R.A., Islamov R.N., Samoylov O.A.
-  **Методы оценки эффективности биоцидной обработки материалов** 32
Обухов Ю.И., Разуваев А.В.
Methods of Evaluating Biocide Treatment of Materials Efficacy
Obukhov Y.I., Razuvaev A.V.
-  **Ранняя диагностика и лечение заболеваний дифтерией, сопряженных с риском для жизни** 36
Корженкова М.П., Берко А.И., Шестакова О.М., Малышев Н.А.
Early Detection and Treatment of Diphtheria Cases, Risk to Life Conjugated
Korzhenkova M.P., Berko A.I., Shestakova O.M., Malyshev N.A.
-  **Иммунопрофилактика кори в организованных коллективах на этапе элиминации коревой инфекции** 42
Никитюк Н.Ф., Юревич М.А.
Immunoprophylaxis of Measles in Organized Collectives at the Stage of Measles Virus Infection Elimination
Nikityuk N.F., Yurevich M.A.

Оригинальные статьи Original Articles

-  **Общие принципы разработки программы доклинических испытаний иммунобиологических лекарственных препаратов, полученных с использованием методов генной инженерии** 45
Авдеева Ж.И., Алпатова Н.А., Волкова Р.А., Борисевич И.В.
General Principles of Preclinical Trials Program Development for Immunobiological Preparations, Derived Using Gene Engineering Methods
Avdeeva Zh.I., Alpatova N.A., Volkova R.A., Borisevich I.V.

Требования к характеристике экспрессирующей конструкции и очищенного белка при проведении доклинических испытаний иммунобиологических лекарственных препаратов, полученных с использованием методов генной инженерии

Волкова Р.А., Авдеева Ж.И., Эльберт Е.В., Алпатова Н.А., Борисевич И.В.

49

The Requirements to Characteristics of Expressing Structure and Refined Protein for Performing Preclinical Trials of New Immunobiological Preparations, Derived Using Gene Engineering Methods

Volkova R.A., Avdeeva Zh.I., Elbert E.V., Alpatova N.A., Borisevich I.V.

Использование жидкой питательной среды из ферментативного гидролизата белков обезжиренного коровьего молока в технологии вакцины чумной живой сухой

Лещенко А.А., Тетерин В.В., Лазыкин А.Г., Ежов А.В., Хонин А.З., Мохов Д.А., Бирюков В.В., Багин С.В., Логвинов С.В.

53

Using of Liquid Nutrient Medium Prepared from Digestion Proteins Hydrolyzate of Skim Cow Milk by Technologing of Vaccine Plague Live Dry

Leshchenko A.A., Teterin V.V., Lazykin A.G., Ezhov A.V., Khonin A.Z., Mokhov D.A., Birjukov V.V., Bagin S.V., Logvinov S.V.



Николай Васильевич Медуницын (к 80-летию со дня рождения)

Nikolay Vasilievich Medunitsyn (to the 80-th anniversary)

19 октября 2011 г. исполняется 80 лет со дня рождения доктора медицинских наук, профессора, заслуженного деятеля науки Российской Федерации академика РАМН Николая Васильевича Медуницына.

Н.В. Медуницын родился в 1931 г. в г. Архангельске, в 1955 г. окончил педиатрический факультет 2-го Московского медицинского института. С 1955 по 1958 гг. был аспирантом на кафедре патофизиологии 2-го медицинского института, затем работал младшим, а после этого – старшим научным сотрудником научно-исследовательской аллергологической лаборатории АН СССР. В 1969 – 1979 гг. он занимал должность заместителя директора по научной работе НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова. 1979 – 1988 гг. – перешел во вновь организованный Институт иммунологии АН СССР, где также занимал должность заместителя директора по научной работе. В течение двадцати одного года (1988 – 2009 гг.) Н.В. Медуницын возглавлял Национальный орган контроля – Государственный НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича, а с 2009 г. является главным научным сотрудником этого института.

В 1961 г. Н.В. Медуницын защитил кандидатскую диссертацию на тему: «О фиксирующей и антителообразующей функции лимфатических узлов». Его докторская диссертация, защищённая в 1971 г., посвящена проблеме замедленной аллергии к растворимым белкам. В 1976 г. ему присвоено ученое звание профессора, в 1999 г. был избран членом-корреспондентом РАМН по специальности «Вакцинология», а в 2004 г. – академиком РАМН по той же специальности.

Академик Н.В. Медуницын является одним из ведущих российских специалистов в области иммунологии и аллергологии. Много сил отдает развитию вакцинологии как самостоятельной ветви медицинской науки. Его монография «Вакцинология» выдержала три издания (1999, 2004, 2011 гг.).

Одним из приоритетных научных направлений Н.В. Медуницына является изучение клеточных механизмов развития поствакцинального иммунитета и замедленной гиперчувствительности. Современные подходы и методы, разработанные Н.В. Медуницыным, изложены в монографии «Повышенная чувствительность замедленного типа. Клеточные и молекулярные основы» (1983).

Н.В. Медуницын выдвинул и экспериментально обосновал новое теоретическое положение об антигенах гистосовместимости как универсальных акцепторах антигенов и как носителях антигенной информации, определяющих иммунологическую индивидуальность

человека при вакцинации. Данные по этой проблеме опубликованы в монографии «Система I-a-антигенов. Генетика, структура, функция» (1987, совместно с Л.П. Алексеевым).

Большой научный вклад Н.В. Медуницын внес в изучение медиаторов иммунного ответа – цитокинов, определяющих развитие иммунитета. Проблемы цитокинов нашли отражение в его ранних монографиях: «Медиаторы клеточного иммунитета и клеточного взаимодействия» (1980) и «Mediators of immune response» (1987, совместно с В.И. Литвиновым и А.М. Морозом). В вирусных вакцинах и других иммунобиологических препаратах Н.В. Медуницыным и его учениками были обнаружены противоспалительные цитокины, изучена динамика изменения уровня цитокинов при инфекциях и вакцинации, показана возможность использования цитокинов в качестве адъювантов при вакцинации против разных инфекционных заболеваний.

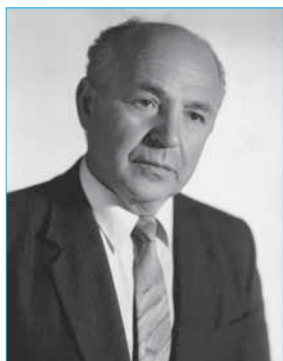
Сегодня Н.В. Медуницын разрабатывает новое научное направление по индивидуализации вакцинации, по использованию различных методов коррекции иммунного ответа на вакцины с целью обеспечения достаточного иммунитета у каждого вакцинированного человека. Ценными для теории и практики являются работы Н.В. Медуницына по изучению источников побочного действия вакцин, работы по стандартизации и контролю иммунобиологических препаратов.

Н.В. Медуницын – автор 410 научных работ, 7 авторских свидетельств и патентов, 9 монографий. Им создана научная школа, под его руководством защищена 21 диссертация (из них 5 докторских). Он автор многочисленных методических и нормативных документов по иммунологии, аллергологии и вакцинологии.

Н.В. Медуницын является экспертом ВОЗ, в течение многих лет был членом Комитета ВОЗ по биологической стандартизации. Большое внимание Н.В. Медуницын уделяет подготовке кадров, в течение многих лет он возглавлял семинары, которые проводились под эгидой ВОЗ на территории России и стран СНГ по вопросам регуляции вакцин, GMP и поствакцинальным осложнениям.

Н.В. Медуницын – член правления общероссийского общества микробиологов, эпидемиологов и инфекционистов, зам. редактора журнала «Биопрепараты», член редколлегий ряда журналов, в том числе журналов «Иммунология», «Эпидемиология и инфекционные болезни».

Н.В. Медуницын награжден дипломами премии РАМН им. В.Д. Тимакова и Академии медико-технических наук им. Е.И. Смирнова, медалью «За заслуги перед отечественным здравоохранением» и Орденом Почета.



Владимир Федорович Попов (к 80-летию со дня рождения)

Vladimir Fedorovich Popov (to the 80-th Anniversary)

1 октября 2011 г. исполняется 80 лет со дня рождения доктора медицинских наук, профессора, заслуженного деятеля науки Российской Федерации члена-корреспондента РАМН Владимира Федоровича Попова.

Владимир Федорович Попов родился в 1931 г. в селе Федоровка Приморского района Донецкой области. В 1957 г. окончил Ленинградский санитарно-гигиенический медицинский институт. После окончания вуза работал главным врачом санитарно-эпидемиологической станции г. Максатихи Калининской области.

В 1962 г. окончил аспирантуру в Институте эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи. После защиты кандидатской диссертации работал в Институте полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова АН СССР научным сотрудником лаборатории эпидемиологии, а затем ученым секретарем и руководителем оргметодотдела.

В 1967 г. В.Ф. Попов назначен на должность заместителя Главного государственного санитарного врача СССР. В 1972 г. он избран руководителем отдела вирусологии ГНИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича, где с перерывами работал до 2011 г. В 1976 – 1978 гг. работал в Монголии советником министра здравоохранения, затем был назначен директором Всесоюзного научно-исследовательского института формирования здорового образа жизни населения МЗ СССР (1984 – 1988 гг.).

В 1973 г. Владимир Федорович защитил докторскую диссертацию. В 1977 г. ему присвоено учёное звание профессора. В 1982 г. – получил звание «Заслуженный деятель науки РФ». В 1999 г. – был избран членом-корреспондентом РАМН по Отделению профилактической медицины, он член-корреспондент Российской академии естественных наук и академик Международной академии информатизации. В.Ф. Попов – почетный член

ряда зарубежных (Германии, Болгарии, Монголии и др.) научных обществ.

Основные научные труды В.Ф. Попова посвящены разработке мер профилактики инфекционных заболеваний, таких как грипп, ОРВИ, корь, эпидемический паротит, краснуха и др. Под руководством ученого была внедрена живая вакцина против эпидемического паротита и разработана ассоциированная паротитно-коревая вакцина, которая широко применяется в РФ и других странах бывшего СССР.

В.Ф. Попов изучил и описал распространение клещевого энцефалита на Европейской равнине Российской Федерации, изучил распространение арбовирусных инфекций. Выделил 24 штамма арбовирусов и описал их очаги на Африканском континенте. Впервые изучил и описал очаги иерсиниоза в Монголии. Ученый работал и проводил противоэпидемические мероприятия в очагах чумы в среднеазиатских республиках и Монголии; холеры – на территории СССР и Африке; вирусного гепатита А – в Афганистане среди воинских континентов; брюшного тифа, дизентерии и других заболеваний.

Ученый опубликовал более 250 научных работ, в том числе монографию, посвященную кори, руководство по эпидемиологическому анализу, Учебник по санитарному просвещению для врачей, справочник врача «Лекарственные формы интерферона». Он имеет 6 авторских свидетельств и 11 патентов.

Под руководством В.Ф. Попова выполнено более 20 кандидатских и докторских диссертаций. Его ученики работают в разных городах и странах (Украина, Беларусь, Болгария, Монголия, США).

В.Ф. Попов – лауреат премии Правительства Российской Федерации, почетный изобретатель СССР, награжден орденом «Знак почета», орденом Почета, медалями СССР, Монголии, Болгарии.

Редколлегия журнала «БИОпрепараты», друзья, коллеги, ученики сердечно поздравляют Николая Васильевича и Владимира Федоровича с юбилеем и желают им крепкого здоровья, счастья и многих лет активной и плодотворной жизни.

Прощай, ГИСК ...

¹Борисевич И.В., ²Супотницкий М.В.

¹ФГБУ «ГИСК им. Л.А. Тарасевича» Минздравсоцразвития России, Москва

²ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздравсоцразвития России, Москва

Farewell to Tarasevich State Control Institute

¹Borisevich I.V., ²Supotnitskiy M.V.

¹Federal State Budgetary Institution «Tarasevich State Research Institute of Standardization and Control of Biological Medicines», Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation.

²Federal State Budgetary Institution «Scientific Center for Expertise of Medical Application Products», Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation.

Необходимость государственного контроля медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП) была осознана русскими врачами еще перед Первой мировой войной. Профессор С. В. Коршун (1868 – 1931 гг.) в 1912 г. предложил создать Контрольный институт, который контролировал бы качество сывороток, ввозимых в Россию и производимых в России, но не занимался их производством. Такое учреждение было создано в августе 1918 г. Л.А. Тарасевичем (1868 – 1927 гг.) и под разными названиями просуществовало до августа 2011 г. Его последнее название Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича» (ФГБУ «ГИСК им. Л.А. Тарасевича»). Специалистами института создана трехступенчатая система контроля МИБП, включающая контроль не только готового препарата, но и его производства. Институт осуществлял государственный надзор за качеством МИБП; выполнял экспертизу нормативной документации, проводил исследования отечественных и зарубежных МИБП в целях их государственной регистрации; осуществлял их сертификацию, выполнял научные исследования по совершенствованию методов стандартизации и контроля качества МИБП; разрабатывал национальные стандарты МИБП; определял требования к условиям производства и контролю качества МИБП; организовывал и проводил расследование поствакцинальных осложнений; осуществлял мероприятия по подготовке кадров, взаимодействие с ВОЗ и национальными органами контроля других стран. В декабре 1995 г. Правительство Российской Федерации возложило на ФГБУ «ГИСК им. Л.А. Тарасевича» функции Национального органа контроля МИБП. В августе 2011 г. ФГБУ «ГИСК им. Л.А. Тарасевича» был реорганизован в форме присоединения к ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации.

Ключевые слова: медицинский иммунобиологический препарат, вакцина, сыворотка, Л.А. Тарасевич, С.В. Коршун, регистрация, сертификация, экспертиза, государственный надзор, стандарт, Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов, Научный центр экспертизы средств медицинского применения.

Библиографическое описание: Борисевич И. В., Супотницкий М. В. Прощай, ГИСК ... // Биопрепараты. – 2011. – № 3. – С. 6–15.

The need for the state control of medical immunobiological preparations (MIBP) was realized by Russian doctors before the World War I. Professor S.V. Korshun (1868 – 1931) suggested in 1912 to found a Control institute which would have controlled the quality of serums, imported to the Russian Federation and produced in it's territory, but which would not have produced them itself. That kind of institution was founded in 1918 by L.A. Tarasevich (1868 – 1927) and existed till August 2011 under different names. It's recent name used to be Federal State Budgetary Institution «Tarasevich State Research Institute of Standardization and Control of Biological Medicines» (FSBI Tarasevich State Control Insitute). The Institute's specialists created the three-stage system of MIBP control, including the control of not only the finished dosage form, but also it's manufacture. The Institute performed state supervision of MIBP quality, the expertise of normative documents, testing of domestic and foreign MIBP for the purpose of their state registration; performed their certification, scientific research of standardization and control of MIBP methods development; elaborated national standards for MIBP, defined the requirements to manufacture conditions and quality control of MIBP; organized and performed investigations of postvaccinal sequelaes; performed professional training arrangements,

interaction with WHO and National control bodies of other countries. In December 1995 the government of the Russian Federation entrusted FSBI Tarasevich State Control Insitute with the functions of the national MIBP control body. In August 2011 FSBI Tarasevich State Control Insitute was reorganized in the form of join to Federal State Budgetary Institution «Scientific Center for Expertise of Medical Application Products» of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation.

Key words: medicinal immunobiological preparation, vaccine, serum, L.A. Tarasevich, S.V. Korshun, registration, certification, expertise, state supervision, standard, State Scientific Research Institute for Standardization and Quality Control of Medicinal Biological Preparations, Scientific Center for Expertise of Medical Application Products.

Bibliographical description: Borisevich I.V., Supotnitskiy M.V. Farewell to Tarasevich State Control Insitute // (Biopharmaceuticals). – 2011. – No. 3. – P. 6–15.

Для корреспонденции:

Супотницкий М.В. – начальник отдела научно-методического обеспечения экспертизы МИБП ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздравсоцразвития РФ.

Адрес: ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздравсоцразвития РФ.

119002, Москва, пер. Сивцев Вражек, 41, supotnitskij@gmail.ru

Статья поступила 04.08.2011, принята к печати 25.08.2011 г.

«Российская Федерация имеет в лице Института им. Л.А. Тарасевича компетентный, сильный и независимый Национальный регулирующий орган, ответственный за качество биологических препаратов и способный осуществлять надлежащий надзор за биологическими препаратами, включая вакцины. Комиссия ВОЗ хотела бы поздравить Институт им. Л.А. Тарасевича с тем, что он соответствует принятым на себя обязательствам, и с высоким уровнем компетентности обеспечивает гарантированное качество всех вакцин, производимых в стране».

Из заключения Комиссии ВОЗ, 3 – 7 декабря 2001 г.

В августе 2011 г. исключено из Единого государственного реестра юридических лиц уникальное научное учреждение – Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов имени Л.А. Тарасевича (ГИСК), на 20 лет переживший создавшую его страну¹. Так, шаг за шагом, уходит в прошлое эпоха советского государственного здравоохранения, ставшего в XX в. образцом для подражания во многих странах мира. Цель данной статьи – исторический анализ деятельности ГИСКА.

Конец XIX в. ознаменовался созданием нового направления в медицине – медицинской микробиологии, давшего мощный толчок прорывным открытиям в лечении инфекционных болезней. Одно из них, способ лечения дифтерии дифтерийной сывороткой, разработанный Эмилем Берингом и Пьером Ру, послужило толчком к массовому выпуску иммунобиологических препаратов на основе сывороток иммунизированных животных. Но эйфория в отношении победы над дифтерией оказалась недолгой. Дифтерийная сыворотка, рассматривавшаяся в качестве панацеи во время спорадических случаев этой болезни, разочаровала русских врачей при большой эпидемии 1909 – 1910 гг. Причины низкой эффективности лечения дифтерийной сывороткой были проанализированы на Совещании по бактериологии, эпидемиологии и проказе, состоявшемся с 16 по 22 января 1911 г. в Москве (с 3 по 9 января по ст. ст.) под председательством В.К. Высоковича. Совещанием установлено несоответствие «содержания антитоксина и лечебного действия сывороток», «пестрота» в качестве и способах ее при-

готовления различными институтами. Поэтому ряд врачей и ученых-бактериологов (Н.И. Тезяков, П.Н. Диатроптов, С.К. Джержговский, Б.Н. Черно-Шварц, С.С. Абрамов, М.М. Гран) высказали мнение о необходимости введения в России контроля над производством дифтерийной сыворотки. Однако в какой форме этот контроль должен осуществляться (общественный, правительственный и пр.) и какой организацией, определено не было. Другой причиной острого отношения Совещания к контролю сывороток стало несовершенство самих методов контроля. Выбрать единые для всех производителей методы контроля без глубоких научных исследований было невозможно.

На Втором совещании по вопросам бактериологии и эпидемиологии, прошедшем с 5 по 14 апреля 1912 г. (с 23.03.1912 г. по 01.04.1912 г. по ст. ст.) в Москве под председательством Л.А. Тарасевича, профессором Степаном Васильевичем Коршуном (1868 – 1931 гг.), директором Харьковского бактериологического института, впервые сформулирована идея о необходимости организации в России «Контрольного института», который бы проводил исследования сывороток и других лечебных бактериологических препаратов, «присылаемых с этой целью заинтересованными лицами и учреждениями». Сама эта идея в общих чертах не была новой. Еще в 1897 г. бактериолог С.К. Джержговский выступил в газете «Врач» с предложением, чтобы один из существующих в России бактериологических институтов взял на себя обязанности по приготовлению Standardserum. Однако замысел С.В. Коршуна состоял в том, чтобы изготовление стандартов, контроль сывороток и других лечебных препаратов осуществлял осо-

¹ В соответствии с Федеральным законом от 8 августа 2001 г. № 129-ФЗ «О государственной регистрации юридических лиц и индивидуальных предпринимателей», на основании распоряжения Правительства Российской Федерации от 17 ноября 2010 г. № 2058-р и приказа Минздравсоцразвития России от 13 декабря 2010 г. № 1102 в Единый государственный реестр юридических лиц внесена запись о прекращении деятельности юридического лица – федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов имени Л.А.Тарасевича» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации. ФГБУ «ГИСК им. Л.А.Тарасевича» Минздравсоцразвития России реорганизовано в форме присоединения к федеральному государственному бюджетному учреждению «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации.

бый контрольный институт, который не занимается их производством. Контрольный институт задумывался им как научно-исследовательская организация. В его задачи должны были входить исследования в области получения и контроля сывороток и «новых лечебных бактериологических и химиотерапевтических препаратов». С.В. Коршун также предложил допускать в Россию только те лечебные сыворотки и бактериологические препараты, которые имеют бесспорное лечебное значение и не изготавливаются русскими лабораториями, подвергая их контролю в «Контрольном институте» наравне с русскими препаратами. Сам же институт должно возглавлять «лицо, зарекомендовавшее себя самостоятельными работами по бактериологии и иммунитету».

Совещание единогласно признало желательным создание в России института для контроля сывороток и вакцин и постановило создать при правлении Пироговского общества особое бюро, которое должно представить предложения по созданию такого института на утверждение ближайшему Пироговскому съезду. Председателем бюро был избран Л.А. Тарасевич (1868 – 1927 гг.). Осуществление замысла С.В. Коршуна началось только во время Первой мировой войны, в 1915 г., после введения в армии обязательной вакцинации против брюшного тифа и холеры. Всероссийский земский союз устроил при бактериологической лаборатории Московских высших женских курсов (сегодня – Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова) станцию контроля вакцин и сывороток, проработавшую под руководством профессора Л.А. Тарасевича два года, до прекращения деятельности Союза. В августе 1918 г., сразу после организации Народного комиссариата здравоохранения РСФСР (НКЗ РСФСР), контрольные функции были переданы Центральной контрольной станции сывороток и вакцин при Бактериологическом институте Московского научного института (руководитель Л.А. Тарасевич; адрес станции: Москва, Сивцев Вражек, дом 41). В июле НКЗ РСФСР организовал Сывороточно-вакцинную комиссию как консультативный орган санитарно-эпидемиологического отдела комиссариата. Ее организатором и первым председателем был Л.А. Тарасевич. Первая запись в книге контроля вакцин Контрольной станции о проконтролированном препарате сделана 29.08.1918 г. С этой даты можно начать отсчет государственного контроля вакцин и сывороток в России.

В начале 1919 г. Контрольная станция становится Государственным институтом контроля сывороток и вакцин. Контрольные функции института расширяются и включают контроль оспенного детрита и сывороток. Директором института назначается Л.А. Тарасевич. Институт небольшой: директор, его заместитель (по 1921 г. доктор Ю.Н. Макарова, затем доктор В.А. Любарский), 7 врачей, 5 лаборантов и 7 технических сотрудников. Сам же институт состоит всего из четырех отделений: контроля сывороток, контроля вакцин, оспенного детрита, изготовления диагностических сывороток. С образованием в 1919 г. Государственного научного института народного здравоохранения (ГИНЗ)², Контрольный институт входит в его состав. ГИНЗ представлял собой конгломерат восьми научно-исследовательских институтов: Институт контроля сывороток и вакцин (с 1923 г. Институт эксперимен-

тальной терапии и контроля вакцин и сывороток), Микробиологический институт, Тропический институт, Институт физиологии питания, Санитарно-гигиенический институт, Биохимический институт и др. Директором ГИНЗа назначен Л.А. Тарасевич, одновременно он сохранил за собой пост директора Института контроля вакцин и сывороток.

Назначение Л.А. Тарасевича на должность директора Контрольного института, определяющего политику в области контроля вакцин и сывороток в России, логично с точки зрения обеспечения их объективного контроля. Он как раз был тем лицом, о котором говорил С.В. Коршун в 1912 г. на Втором совещании по вопросам бактериологии и эпидемиологии. Л.А. Тарасевич имел значимые в то время работы по эпидемиологии и иммунологии (он основоположник теории об опсонинах, приписываемой на Западе исключительно А. Райту), но никогда не работал в организациях, производящих вакцины и сывороточные препараты. Мы не обнаружили ни одной его работы, имеющей отношение к контролю качества вакцин и сывороток. С.В. Коршун в создании Контрольного института участия не принимал. В 1919 г. он боролся с холерой и сыпным тифом в армии Деникина, отступавшей под напором Красной армии. Отклонив все предложения об эвакуации, С.В. Коршун остался в Новороссийске вместе с завшивленными ранеными и больными русскими людьми, побежденными в ту войну. Его возвращение в Харьков не было простым и быстрым. В 1923 г. нарком Н.А. Семашко переводит его из Харькова в Москву, назначив директором Института инфекционных болезней им. И.И. Мечникова (сегодня НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова), где С.В. Коршун тесно взаимодействует с Л.А. Тарасевичем по разработке и производству стандартных препаратов лечебных и профилактических сывороток.

Однако жить обоим основоположникам государственного контроля вакцин и сывороток в России осталось уже недолго. В 1927 г. в Германии, в санатории, в возрасте 59 лет, неожиданно для всех, кто знал состояние его здоровья, умирает Л.А. Тарасевич. С.В. Коршуна в августе 1930 г. арестовывают по малоизвестному даже сегодня «Делу микробиологов», в котором фигурирует бывший сотрудник Л.А. Тарасевича, германский подданный Ганс Цейсс (Heinz Zeiss), основавший в 1925 г. в Контрольном институте музей живых культур. Как оказалось, Цейсс вовсе не был бескорыстным другом новой России. Его миссия заключалась в сборе на ее территории штаммов опасных микроорганизмов и тайной их передаче в германские бактериологические институты. Цейсс попался на передаче штаммов возбудителя туляремии – весьма перспективного агента для создаваемого в те годы бактериологического оружия. С.В. Коршун умер в Бутырской тюрьме в 1931 г., Цейсса арестовали в 1945 г. в восточной оккупационной зоне Германии, судили, приговорили к 25 годам заключения, в 1949 г. он умер во Владимирской тюрьме.

В январе 1928 г. директором института назначен профессор П.Н. Диатропов (1858 – 1934 гг.). Институт в то время был крайне стеснен в помещениях. Он занимал 3-й этаж здания № 41 по Сивцеву Вражку, три комнаты на втором этаже, и две комнатки на пер-

² Всего за первые 10 лет Советской власти в нашей стране, перенесшей Первую мировую и Гражданскую войны и не имевшей тогда сверхдоходов от экспорта энергоресурсов, было организовано 40 научно-исследовательских институтов. Среди них: Институт микробиологии и эпидемиологии в Саратове (1918), Бактериологический институт в Тифлисе (1918), Институт инфекционных болезней им. И. И. Мечникова (1919), Государственный венерологический институт (1921), Институт охраны материнства и младенчества (1922), Институт профессиональных заболеваний (1923), Институт переливания крови (1926), Институт мозга (1927) в Москве и др.

вом. Отделение контроля противоскарлатинозных и противодифтерийных сывороток располагалось непосредственно в кабинете директора. Научно-практическая работа института состояла в контроле вакцин и сывороток, оспенного детрита, туберкулина, изготовлении вакцинных, дифтерийных и столбнячных стандартов, изготовлении туберкулезной вакцины на основе штамма VCG, привезенного Л.А. Тарасевичем из Института Пастера (Париж). Все бактериальные препараты контролировались на безвредность и стерильность; вакцины, сыворотки (противодифтерийная, противостолбнячная, противодизентерийная), оспенный детрит и туберкулин стандартизировались. По этим же проблемам велась исследовательская работа. На основе первых отделений Института впоследствии были созданы лаборатории, сохранившиеся до 2011 г.: лаборатория антирабических препаратов и лаборатория осповакцины (объединены в 1986 г. в лабораторию бешенства и оспы), лаборатория микобактериальных препаратов, лаборатория сывороток (включена в лабораторию анатоксинов и антитоксических препаратов путем объединения с музеем анаэробных культур); лаборатория коллекционирования микроорганизмов.

В 1930-е гг. входившие в ГИНЗ институты стали самостоятельными научными учреждениями. В конце 1931 г. Институт экспериментальной терапии и контроля вакцин и сывороток переименовали в Государственный научный контрольный институт им. Л.А. Тарасевича (ГНКИ). Тогда он состоял из шести отделов: контроля противодифтерийной и других сывороток; контроля кишечных вакцин и бактериофагов; контроля оспенного детрита; контроля антирабической вакцины и вакцины БЦЖ; контроля препаратов против анаэробных инфекций и отдела живых культур и туберкулина. В этот период задачи института формулировались следующим образом: контроль бактериальных препаратов и снабжение производственных институтов стандартами сывороток и штаммами патогенных микроорганизмов; разработка методов бактериологического и серологического контроля препаратов; проведение научно-исследовательских работ в области иммунитета в связи с вопросами вакцинации.

С 1930 г. в СССР в обращение выпускаются только такие препараты вакцин и сывороток, которые имеют контрольный номер, т.е. номер, под которым Контрольным институтом дано разрешение на выпуск. Этот номер должен находиться на упаковке, в которой препарат поступает в обращение. В то же время и в Институте, и в Наркомздраве понимали, что контроль серий остается формальным. Такой контроль бракует негодные препараты, но не устраняет причины брака. Отсутствовал контроль и над эффективностью препарата в процессе его применения. Поэтому система контроля бактериальных препаратов развивалась дальше. Когда была решена задача охвата контролем всех серий бактериальных препаратов, перед Институтом была поставлена задача присоединить к этому контролю непосредственное наблюдение над производством путем его обследования командированными бригадами сотрудников ГНКИ. В самих производственных институтах были созданы местные контрольные комиссии. В состав комиссий входили квалифицированные производственники и эпидемиологи, их обучение осуществлял ГНКИ в плановом порядке. В 1934 г. контроль на всех стадиях производства был возложен на организованные местные контрольные лаборатории, т.е. была установлена трехступенчатая система контроля: на производстве, в местных контрольных лабораториях и в ГНКИ. Такая система продержалась до реорганизации института Л.А. Тарасевича в 2011 г.

В 1930-х гг. в тематику Института входят работы по анаэробным инфекциям (газовая гангрена и ботулизм). Разрабатываются методы изготовления, контроля и учета эффективности применения сывороток против газовой гангрены. Исследования качества препаратов разных производителей позволяло получать ясную картину состояния их производства в целом по стране. К середине 1930-х гг. работа Института заметно сказалась на качестве производимых в СССР вакцин и сывороток. Снизилось количество забракованных по проросту посторонней микрофлоры партий вакцин, повысился средний титр противодифтерийных, противостолбнячных, противодизентерийных сывороток. Началось исследование по стандартизации вакцин уже не только по титрам антител, но и по их avidности.

Научные исследования Института расширились по мере увеличения решаемых задач. Если с 1920 г. по 1925 г. было выполнено 34 темы, то за такой же период с 1926 г. по 1930 г. были закончены 62 научные работы, с 1932 г. по 1935 г. – 118 работ, с 1936 г. по 1940 г. – 178 работ.

Великая Отечественная война внесла жестокие коррективы в жизнь всей страны. В декабре 1941 г. право выпуска каждой серии препарата и выдачи контрольного номера было передано местным контрольным лабораториям. Заведующие этими лабораториями числились в штате ГНКИ, за которым оставалось право выборочного последующего контроля и предварительного контроля новых препаратов и взятие препаратов на предварительный контроль при неблагоприятном производстве. В 1942 г. в ГНКИ была организована биохимическая лаборатория (первый руководитель – доктор биологических наук, профессор А.М. Кузин). В 1945 г. организована лаборатория питательных сред (первый руководитель – Е.И. Савина). В годы Великой Отечественной войны погибло не менее 120 сотрудников ГНКИ и их родственников.

После Великой Отечественной войны в СССР была создана промышленность по выпуску антибиотиков. Контроль их качества был поручен ГНКИ. Роль Контрольного института в становлении промышленного производства антибиотиков была не меньшей, чем вакцинно-сывороточного производства. В 1961 г. одно из Свердловских предприятий по производству эритромицина было даже временно закрыто из-за выпуска нестандартного по качеству препарата. Только после полного освоения технологии производства эритромицина и предварительного контроля в ГНКИ 30 серий препарата, его промышленное производство возобновилось.

В 1950-х гг. на контроль стали поступать препараты против вирусных инфекций (полиомиелитные и гриппозные вакцины, вакцины и гамма-глобулин против клещевого энцефалита и др.). Для его осуществления были организованы лаборатории энтеро- и ротавирусных инфекций (первый руководитель – доктор мед. наук, профессор Г.Я. Свет-Молдавский), противоязвенных препаратов (первый руководитель – кандидат мед. наук З.Ф. Зубов) и группа иммуноглобулинов (первый руководитель – кандидат мед. наук И.Д. Лоран). Тогда же создана лаборатория планирования НИР и сертификации МИБП (первый руководитель – кандидат вет. наук И.Р. Замурий).

В 1963 г. организована лаборатория аллергенов (первый руководитель – доктор мед. наук, профессор В.А. Фрадкин). В 1966 г. в результате слияния лаборатории оптических методов исследования (руководитель Б.А. Фихман) и лаборатории сушки (руководитель М.Н. Бакина) создана лаборатория физических мето-

дов исследования (первый руководитель – доктор биол. наук В.Г. Петухов).

В 1966 г. создана лаборатория бактериофагов (первый руководитель – кандидат мед. наук Л.Д. Перемитина). В 1967 г. создана лаборатория трансфузионных вирусных гепатитов и контаминантов (первый руководитель – доктор мед. наук И.Н. Доброва). В 1960-е гг. организована лаборатория бактериальных вакцин и пробиотиков (первый руководитель – кандидат мед. наук Е.Н. Меликова).

В 1969 г. создана лаборатория оценки побочного действия МИБП и стандартизации нормативной документации (руководитель – кандидат мед. наук Н.А. Озерецковский). В 1971 г. из отдела препаратов против вирусных вакцин выделена в самостоятельное подразделение лаборатория кори, паротита, краснухи и интерферонов (первый руководитель – доктор мед. наук, профессор, член-корреспондент РАМН В.Ф. Попов). В 1971 г. организована лаборатория эпидемиологических методов экспертизы качества МИБП (первый руководитель – доктор мед. наук, профессор А.А. Сумароков). В 1974 г. создана лаборатория особо опасных инфекций как филиал ГИСКА (первый руководитель – доктор мед. наук, профессор Т.И. Анисимова). Лаборатория существовала с 1930-х гг., но организационно входила в состав института «Микро» (Саратов). В 1977 г. на основе группы иммуноглобулинов создана лаборатория иммуноглобулинов (первый руководитель – кандидат мед. наук И.Д. Лоран). В 1981 г. создана лаборатория гриппа, парагриппа и других ОРЗ (руководитель – кандидат мед. наук Н.И. Лонская). В 1993 г. создана лаборатория иммунологии (первый руководитель – доктор мед. наук, профессор, академик РАМН Н.В. Медуницын).

В Институте в разные периоды времени работали известные ученые: А.Д. Альштейн, О.Г. Анджапаридзе, З.М. Андреева, Т.А. Бектимиров, В.П. Брагинская, Б.Д. Быченко, В.И. Вотяков, Г.В. Выгодчиков, Ю.З. Гендон, Н.Н. Гинсбург, Л. А. Гинце, Е.В. Глотова, С.Г. Дзагуров, Н.А. Живаго, П.Ф. Здродовский, А.Т. Кравченко, В.А. Любарский, Е.Н. Меликова, И.Ф. Михайлов, М.П. Покровская, В.Ф. Попов, В.Д. Равич-Биргер, Ф.Ф. Резепов, Р.А. Салтыков, Е.Д. Соловьев, А.А. Сумароков, А.И. Тунцова, Ф.А. Черткова, Л.М. Хатенев, Т.Б. Яблокова и др.

Человеческий фактор всегда присутствует в производстве иммунобиологических препаратов, и только постоянный контроль способен смягчить последствия чьей-то безответственности и халатности. В 1961 г. в НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова из-за несоблюдения технологического режима противокоревой гамма-глобулин (человеческий) был смешан с антирабическим лошадиным. Введение препарата вызвало анафилактический шок у нескольких детей. До половины серий противостолбнячной сыворотки, выпускаемых Тбилисским институтом вакцин и сывороток в 1961 г., не содержали требуемого титра антител. В Ташкентском институте вакцин и сывороток в начале 1960-х гг. ГНКИ было забраковано 86 серий антирабической вакцины из-за ее нестерильности. В 1966 г. в Донецкой области было возбуждено уголовное дело по факту вспышки брюшного тифа среди детей (258 случаев). Комиссионным бактериологическим обследованием установлено, что заболевания вызваны применением дизентерийного бактериофага серии 434 производства Тбилисского НИИ вакцин и сывороток, содержащего бактерии брюшного тифа. В результате этого случая и было принято решение об организации в ГНКИ специализированной лаборатории по стандартизации и контролю препаратов бакте-

риофагов. В 2000 г. ГИСК приостановил выпуск вакцины против клещевого энцефалита производства Томского института вакцин и сывороток из-за высокого содержания в вакцине гетерологического белка.

Ошибки и недостатки советского времени носили случайный характер. При их обнаружении они быстро устранялись усилиями как самих производителей препаратов, так и специалистов ГИСКА. Ситуация на рынке иммунобиологических препаратов в России резко ухудшилась в начале 1990-х гг. после расчленения СССР, когда возможность быстрого и хищнического обогащения привела к системным нарушениям в практике производства медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП). Появились многочисленные мелкие производства, неспособные выпускать качественную продукцию, грубо стали нарушаться правила реализации МИБП, на рынке объявились незарегистрированные отечественные и зарубежные МИБП. В этой ситуации сложившаяся советская система надзора за качеством МИБП, предполагающая не только контроль конечной продукции, но, прежде всего, создания условий, гарантирующих выпуск качественных МИБП, оказалась очень востребованной. Правительство Российской Федерации издало постановление № 1241 от 18.12.1995 г., в котором возложило функции Национального органа контроля МИБП на ГИСК. Национальный орган контроля МИБП осуществлял государственный надзор за качеством МИБП; проводил экспертизу нормативной документации, испытания отечественных и зарубежных МИБП в целях их государственной регистрации; осуществлял их сертификацию, выполнял научные исследования по совершенствованию методов стандартизации и контроля качества МИБП; разрабатывал национальные стандарты МИБП; определял требования к условиям производства и контролю качества МИБП; организовывал и проводил расследование поствакцинальных осложнений; осуществлял мероприятия по подготовке кадров, взаимодействие с ВОЗ и Национальными органами контроля других стран.

Особо надо отметить то, что работа ГИСКА после событий 1991 г. происходила в условиях ограниченного финансирования, сотрудники института получали крайне низкие зарплаты. Коллектив института в те годы был в основном женский. Именно на плечах этих замечательных женщин-заведующих лабораториями, продолжался ГИСК почти 20 лет: Ж.И. Авдеевой, Т.Г. Бенциановой, Р.А. Волковой, М.С. Воробьевой, О.С. Дарбеевой, Л.Г. Карпович, Л.К. Лаптевой, Д.Т. Леви, Н.И. Лонской, Л.В. Минаковой, О.В. Перельгиной, С.Ф. Радунской, А.С. Рогачевой, В.Ф. Руновой, Л.В. Саяпиной, М.К. Строгановой, С.М. Сухановой, Р.П. Чуприниной, Н.В. Шалуновой, Т.С. Шобуховой.

Огромная заслуга в том, что в те хаотичные годы ГИСК продолжал функционировать, а не развалился, как сотни других научных учреждений России, принадлежит академику РАМН Главному государственному санитарному врачу РФ Г.Г. Онищенко, академику РАМН Н.В. Медуницыну, который руководил институтом в это время, и его заместителям профессорам Т.А. Бектимирову, Л.В. Салмину, А.А. Мовсесянцу, М.А. Горбунову. Сотрудники ГИСКА регулярно инспектировали предприятия, производящие МИБП, на предмет соблюдения ими надлежащих условий производства. Существовала постоянная творческая и профессиональная связь между ГИском и предприятиями, производящими МИБП. Вместе с производственными институтами и предприятиями Институт продолжал заниматься вопросами стандартизации МИБП и совершенствованием методов их контроля.

С учетом особенностей производства и контроля МИБП в 1997 г. Госстандарт зарегистрировал самостоятельную систему обязательной сертификации МИБП, отличную от системы сертификации других лекарственных средств. Был утвержден знак соответствия системы сертификации МИБП. Благодаря эффективно действующей системе государственного надзора за качеством МИБП, осуществляемой ГИСК, отечественные МИБП по своей безопасности и активности соответствуют требованиям ВОЗ. Среди МИБП, используемых в России, практически нет фальсифицированных препаратов.

На базе ГИСКА продолжали работу Комитет МИБП и Комитет по медицинской этике. Исторически прообразом Комитета МИБП была сывороточно-вакцинная комиссия, организованная еще в 1918 г. Л.А. Тарасевичем. Основными задачами Комитета МИБП был анализ программ и отчетов испытаний новых МИБП и выдача рекомендаций Министерству здравоохранения о возможности их регистрации. ГИСК являлся головным учреждением по научной проблеме «Разработка и стандартизация медицинских биологических препаратов для профилактики инфекционных болезней» (таблица).

Основные направления исследований лабораторий ГИСКА в 2010 г.

Лаборатория (руководитель)	Направление исследований
Лаборатория биохимии и биотехнологии (доктор биол. наук Рауза Асхатовна Волкова)	Разработка, унификация и валидация химических, физико-химических и иммунохимических методов контроля качества МИБП, разработка отраслевых стандартных образцов для указанных методов. Разработка систем испытания диагностических наборов на основе ПЦР для выявления возбудителей гепатитов В и С и возбудителей бактериальных инфекций.
Лаборатория арбовирусных инфекций, риккетсиозов и ВИЧ-инфекции (доктор мед. наук, профессор Мая Сергеевна Воробьева)	Выбор и аттестация штаммов вируса клещевого энцефалита (КЭ), изучение их нейровирулентности, совершенствование методов оценки иммуногенности вакцины КЭ. Разработка стандартов активности вакцин против желтой лихорадки и японского энцефалита, аттестация ИФА тест-систем для диагностики геморрагических лихорадок. Участие в разработке культуральной очищенной концентрированной вакцины против венесуэльского энцефаломиелита. Изучение эффективности современных вакцин КЭ против штаммов урало-сибирского генотипа вируса КЭ. Изучение препаратов для профилактики, диагностики и лечения заболеваний, вызванных герпесвирусом, цитомегаловирусом, хламидиями и риккетсиями. Разработка и внедрение в практику оценки качества ИФА тест-систем стандартных панелей сывороток. Испытания отечественных и зарубежных тест-систем для диагностики ВИЧ-инфекции; разработка стандартной панели сывороток для их оценки. Разработка и аттестация методов контроля первой отечественной вакцины против ГЛПС «Комби-ГЛПС-вак». Сравнительное изучение и апробация кандидатных вакцин против ВИЧ/СПИД.
Лаборатория кори, паротита, краснухи и интерферонов (канд. мед. наук Лидия Александровна Гайдерова)	Стандартизация и разработка методов контроля вакцин против кори, паротита и краснухи, изучение биологических свойств вакцинных штаммов вирусов кори, паротита, краснухи, разработка методов иммунологической оценки эффективности иммунизации препаратами против кори и паротита. Совместно с другими организациями – разработка отечественной ассоциированной паротитно-коревой вакцины, а также различных лекарственных форм интерферонов. Обеспечение производственных и научно-исследовательских учреждений национальными стандартными образцами активности коревой и паротитной вакцин и интерферонов, коревого и паротитного гемагглютинирующих антигенов, коревых и паротитных антител. Проведение исследований по разработке новых и усовершенствованию существующих стандартных образцов.
Отдел эпидемиологических методов экспертизы качества МИБП (доктор мед. наук, профессор Михаил Александрович Горбунов)	Разработка методических принципов оценки профилактической, эпидемиологической и экономической эффективности гриппозных вакцин. Полевые испытания диагностических систем и питательных сред.
Лаборатория коллекционирования микроорганизмов (канд. биол. наук Дмитрий Сергеевич Давыдов)	Изучение влияния различных методов консервации на культуральные свойства микроорганизмов III-IV групп патогенности ГКПМ ГИСК им. Л.А. Тарасевича; биохимическая идентификация коллекционных микроорганизмов сем. Enterobacteriaceae ГКПМ ГИСК им. Л.А. Тарасевича; разработка питательных сред для дифференциации бактерий; стандартизация диагностических препаратов; разработка программного средства "База данных, описывающая коллекцию патогенных микроорганизмов III-IV групп".

<p>Лаборатория условно-патогенных бактерий и бактериофагов (канд. мед. наук Ольга Сергеевна Дарбеева)</p>	<p>Изучение диапазона действия препаратов бактериофагов в отношении актуальных возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний и кишечных инфекций. Изучение возможности использования препаратов бактериофагов в лечении и профилактике биопленочных хронических уроинфекций. Совершенствование экспертизы качества препаратов бактериофагов. Изучения фаговых рас, входящих в состав препаратов бактериофагов, с использованием молекулярно-генетических методов исследования.</p>
<p>Лаборатория вирусных кишечных инфекций и молекулярной биологии (канд. мед. наук Владимир Александрович Шевцов)</p>	<p>Изучение корреляции между показателями иммуногенной активности и содержанием ВГА в препарате. Определение специфической активности в препаратах инаktivированных вакцин, предназначенных для профилактики полиомиелита, стандартизация определения специфической активности вакцин.</p>
<p>Лаборатория иммуноглобулинов (канд. мед. наук Людмила Константиновна Лаптева)</p>	<p>Сравнительное изучение отдельных качественных показателей препаратов иммуноглобулина человека отечественного и зарубежного производства, предназначенных для внутривенного введения. Отработка методов контроля качества специфических иммуноглобулинов: антистафилококкового, противостолбнячного, против клещевого энцефалита, противаллергического, антиротавирусного, иммуноглобулина против гепатита В, иммуноглобулина человека нормального для внутривенного введения, а также методов контроля и стандартизации препаратов стафилококковых анатоксинов, моносpezifических сывороток к Ig G, A, M. Выпуск национальных стандартных образцов 4 наименований: антиальфа-стафилолизина, содержания белка в иммуноглобулине, тест-системы для определения антигенного состава препаратов из сыворотки крови человека методом ИЭФ, пирогена, которыми обеспечивались производственные предприятия, а также учреждения службы крови.</p>
<p>Лаборатория микобактериальных препаратов (доктор мед. наук, профессор Диана Тимофеевна Леви)</p>	<p>Изучение вакцинных штаммов БЦЖ; разработка стандартных методов оценки биологической активности туберкулезной (БЦЖ) вакцины; установление оптимального показателя жизнеспособности, обеспечивающего наибольшую специфическую защиту организма при минимальном числе поствакцинальных осложнений; изучение зависимости поствакцинальных осложнений от биологической активности вакцины. Совместные исследования по разработке нового комплексного способа выявления инфицированных лиц и наблюдения за лицами из групп риска по заболеванию туберкулезом в условиях диспансера.</p>
<p>Лаборатория гриппа, парагриппа и других ОРЗ (канд. мед. наук Наталья Ивановна Лонская)</p>	<p>Изучение вакцинных и производственных штаммов вируса гриппа, качества вновь разрабатываемых гриппозных вакцин. Разработка отраслевых стандартных образцов для определения активности инаktivированных гриппозных вакцин из актуальных штаммов (количественное определение гемагглютинина в инаktivированных гриппозных вакцинах, ежегодно), участие в государственных испытаниях отечественных и зарубежных препаратов.</p>
<p>Лаборатория бешенства и оспы (доктор мед. наук, профессор Арташес Авакович Мовсесянц)</p>	<p>Разработка критериев оценки щадящих и комбинированных методов вакцинации против оспы, вновь разрабатываемых вакцин нового поколения: рекомбинантной и таблетированной вакцин. Постмаркетинговая оценка диагностической эффективности ПЦР-системы для дифференциальной диагностики ортопоксвирусов. Исследования по изучению вакцинных штаммов, совершенствованию методов контроля осповакцины и вакцины против бешенства, антирабического иммуноглобулина. Участие в межлабораторных исследованиях, проводимых ВОЗ, по испытаниям кандидата в стандартные образцы специфической активности оспенной вакцины и вакцины против бешенства. Испытание новой концентрированной антирабической вакцины с использованием перевиваемой клеточной линии Vero. Внедрение прямого дот-иммуноанализа как альтернативного экспресс-метода для определения специфической активности препаратов антирабического иммуноглобулина. Анализ и расследование поствакцинальных реакций и осложнений, развившихся после применения антирабических препаратов.</p>
<p>Лаборатория аллергенов (канд. мед. наук Стелла Филипповна Радунская)</p>	<p>Изучение иммунологических свойств аллергенов, разработка методов оценки качества препаратов для диагностики аллергии <i>in vivo</i>, разработка методов оценки качества диагностических тест-систем определения общего и специфического Ig E, иммуноглобулинов класса A, M и G. Разработка панелей позитивных специфических сывороток крови для стандартизации и контроля качества неинфекционных аллергенов и диагностических тест-систем. Разработка метода оценки подлинности и активности аллергенов в условиях <i>in vitro</i>.</p>
<p>Лаборатория препаратов против чумы и других ООИ (доктор мед. наук Лидия Васильевна Саяпина)</p>	<p>Разработка критериев оценки туляремийных вакцинных штаммов и противотуляремийного иммунитета у вакцинированных людей. Совершенствование технологии получения сыворотки бруцеллезной диагностической поливалентной для реакции агглютинации и использование ее в качестве стандартного отраслевого образца (ОСО). Участие в исследованиях по разработке современных безопасных химических вакцин против возбудителя холеры и по созданию универсальной технологии их производства.</p>

<p>Лаборатория физических методов исследования (доктор биол. наук Валерий Георгиевич Петухов)</p>	<p>Проведение метрологической экспертизы, аттестации и регистрации отраслевых стандартных образцов, применяемых для контроля качества МИБП. Актуализация Реестра отраслевых стандартных образцов, разработанных и аттестованных ГИСК им. Л.А. Тарасевича. Исследования в области оптической стандартизации бактериальных суспензий. Изготовление отраслевых стандартных образцов мутности, применяемых для обеспечения единства измерений концентрации микробных клеток в бактериальных взвесах при производстве и контроле качества МИБП, при стандартизации ветеринарных бактериальных препаратов, а также в области экспериментальной, технической и общей микробиологии. Стандартизация параметров процесса лиофилизации, исследования в области замедленной флуоресценции бактерий и процессов замораживания и высушивания микробных клеток.</p>
<p>Лаборатория бактериальных вакцин и пробиотиков (доктор мед. наук Раиса Павловна Чупринина)</p>	<p>Разработка системы измерения и оценки качества коклюшного компонента в АКДС-вакцине; усовершенствование и стандартизация методов и критериев оценки биологических свойств свежевыделенных и производственных штаммов коклюшных бактерий. Стандартизация и усовершенствование методов контроля иммуногенной активности коклюшной и брюшнотифозных вакцин; разработка национальных образцов для оценки остаточной токсичности коклюшного компонента. Усовершенствование методов и критериев оценки специфической активности пробиотиков. Разработке и стандартизации методов контроля новых пробиотиков, изготовленных на основе непатогенных споровых представителей рода <i>Bacillus</i>.</p>
<p>Лаборатория трансфузионных вирусных гепатитов и контаминантов (доктор мед. наук Нина Васильевна Шалунова)</p>	<p>Сравнительное изучение зарегистрированных в России отечественных и зарубежных рекомбинантных вакцин против гепатита В по показателям специфической активности и безопасности. Изучение препаратов для выявления антител и антигенов вирусных гепатитов В, С, Дельта. Участие в сравнительных испытаниях отечественных и зарубежных тест-систем с целью внедрения в практику наиболее чувствительных и специфических препаратов. Разработка стандартных панелей сывороток для определения аналитической и диагностической чувствительности диагностикумов. Изучение и аттенуация культур клеток (гетероплоидных и диплоидных), оценка пригодности банков клеток для производства профилактических и диагностических иммунобиологических препаратов, совершенствование методов контроля клеток в отношении их онкогенной и опухолевой безопасности <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i>. Совершенствование методов выявления контаминантов в органах и тканях различных животных и птиц, в том числе у птиц, эмбрионы которых используются для производства коревой и паротитных вакцин.</p>
<p>Лаборатория анатоксинов и антиоксидантных препаратов (канд. мед. наук Ольга Викторовна Перелыгина)</p>	<p>Разработка и калибровка в соответствии с международными стандартами национальных стандартных образцов для оценки специфической активности вакцинных и сывороточных препаратов. Разработка методов экспресс-определения содержания столбнячного анатоксина в сыворотке крови человека в целях определения необходимости экстренной профилактики.</p>
<p>Лаборатория оценки побочного действия МИБП и стандартизации НД (канд. мед. наук Николай Аркадьевич Озерецковский)</p>	<p>Патоморфологическая оценка безопасности вакцинных штаммов и штаммов пробиотиков; патоморфологическое изучение летальных исходов в поствакцинальном периоде; контроль нейровирулентности живой полиомиелитной вакцины.</p>
<p>Лаборатория иммунологии (доктор мед. наук, профессор Жанна Ильдаровна Авдеева)</p>	<p>Разработка и совершенствование иммунологических методов контроля специфической активности отечественных и зарубежных МИБП, в том числе генно-инженерных. Участие в разработке новых отечественных препаратов на основе рекомбинантных и природных цитокинов и других биологически активных белковых молекул. Участие в разработке отраслевых стандартных образцов для определения специфической активности соответствующих МИБП.</p>
<p>Лаборатория бактериологических питательных сред (кандидат медицинских наук Светлана Михайловна Суханова)</p>	<p>Оценка качества более 200 наименований бактериологических питательных сред и их основ отечественного и зарубежного производства. Испытания новых питательных сред и экспертиза научной документации (НД) при освоении производства. Обеспечение заинтересованных организаций штаммами для контроля качества тиогликолевой среды. Участие в разработке НД по стандартизации и совершенствованию методов контроля качества питательных сред.</p>
<p>Лаборатория планирования НИР и сертификации МИБП (канд. биол. наук Елена Эдуардовна Евреинова)</p>	<p>Планирование и координация научно-исследовательских работ в области экспертизы качества, эффективности и безопасности МИБП. Осуществление мероприятий по подтверждению соответствия МИБП требованиям НД.</p>

Существовала тесная связь ГИСКА с ВОЗ. В своих основных направлениях деятельности ГИСК следовал рекомендациям ВОЗ. Он участвовал в межлабораторных испытаниях биологических стандартов и методов контроля, проводимых под эгидой ВОЗ. Директор ГИСКА и его заместители являлись членами экспертного Комитета по стандартизации биологических препаратов ВОЗ. Миссия ВОЗ, посетившая ГИСК в 2001 г., дала высокую оценку деятельности института как Национального органа контроля иммунобиологических препаратов.

ГИСК проводил активную и последовательную научно-практическую работу. Раз в два года на его базе проводилась всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Вакцинология». В конференции, состоявшейся 9 – 10 ноября 2010 г., приняли участие 252 делегата из разных регионов Российской Федерации, представители зарубежных стран (Белоруссия, Украина, Узбекистан, Франция, Италия, США) и Всемирной организации здравоохранения.

С января 2000 г. ГИСКом регулярно издается научно-практический рецензируемый журнал «Биопрепараты», публикующий статьи по проблемам разработки и совершенствования биологических препаратов, традиционно применяющихся в области инфекционной патологии (вакцины, иммуноглобулины, сывороточные препараты, пробиотики, бактериофаги, иммуностимуляторы, цитокины, аллергены, диагностические тест-системы и др.). В 2010 – 2011 гг. ГИСКом издан уникальный справочник «Медицинские иммунобиологические препараты» в двух томах (т. 1 Вакцины; т. 2 Иммуноглобулины человека, сыворотки и иммуноглобулины гетерологичные, моноклональные антитела, пробиотики, бактериофаги, аллергены, цитокины).

В 2011 г. в институте работали 222 сотрудника, из них 16 докторов наук, 10 профессоров, 74 кандидатов наук, 32 старших научных сотрудников, один академик РАН, один заслуженный деятель науки РФ, три заслуженных врача РФ, три лауреата премии Правительства РФ, один лауреат премии Совета Министров СССР, один лауреат премии РАН им. В.Д. Тимакова.

ДИРЕКТОРАМИ ГИСКА РАБОТАЛИ ТАКИЕ ИЗВЕСТНЫЕ УЧЕНЫЕ, КАК

**Л.А. ТАРАСЕВИЧ (1918 – 1927),
П.Н. ДИАТРОПТОВ (1928 – 1934),
Л.М. ХАТЕНЕВЕР (1935 – 1948),
С.И. ДИДЕНКО (1949 – 1959),
Л.С. ОГЛОБЛИНА (1959 – 1962),
И.Ф. МИХАЙЛОВ (1962 – 1965),
А.Т. КРАВЧЕНКО (1965 – 1967),
С.Г. ДЗАГУРОВ (1967 – 1984),
Т.А. БЕКТИМИРОВ (1986 – 1988),
Н.В. МЕДУНИЦЫН (1988 – 2009),
И.В. БОРИСЕВИЧ (2010 – 2011)**

Практически 100-летняя история становления, развития и совершенствования отечественной системы контроля и надзора за качеством, эффективностью и безопасностью медицинских иммунобиологических препаратов неразрывно связана с именем Л.А. Тарасевича и переулком Сивцев Вражек. И в России, и за рубежом специалистам в области разработки и производства МИБП ГИСК им. Л.А. Тарасевича был хорошо известен.

Сейчас Контрольный институт имени Л.А. Тарасевича реорганизован. Правительство Российской Федерации своим распоряжением определило необходимость создания единой мощной отечественной структуры, предназначенной для осуществления экспертизы качества, эффективности и безопасности всех лекарственных средств (включая иммунобиологические препараты). Ветераны и молодые сотрудники ГИСКА – полноправные члены коллектива ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, в котором на новом современном уровне будет создана лабораторная база, организовано повышение квалификации экспертов и лаборантского состава и, в целом, обеспечена эффективность государственного контроля за иммунобиологическими лекарственными препаратами, поступающими в обращение на территории Российской Федерации.

Генотерапевтические векторные системы на основе вирусов

Супотницкий М. В.
ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздравсоцразвития России, Москва

Genotherapeutic Vector Systems Based on Viruses

Supotnitskiy M. V.
Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expertise of Medical Application Products»,
Minzdravsocrazvitia RF

Основным объектом при проведении экспертизы на возможность медицинского применения генетических конструкций на основе вирусов, предназначенных для введения генов в геном человека, являются получаемые биотехнологическим путем структуры, имитирующие в организме человека поведение вирусной частицы, но не вызывающие инфекционный процесс. В их состав входят: белки вируса, формирующие оболочку частицы, способную к узнаванию клеток-мишеней и к интернализации в цитоплазму; и трансген-экспрессирующая кассета, осуществляющая после доставки в клетку длительную экспрессию одного или нескольких генов. Распространение в практике генной терапии наследственных и инфекционных болезней приобрели векторные системы на основе лентивирусов, аденовирусов, аденоассоциированных вирусов, ортопоксвирусов, герпесвирусов и отдельных РНК-вирусов, не относящихся к ретровирусам. Достигнутый уровень генной инженерии позволяет создавать векторные системы, нацеленные на разные типы клеток и участки генома человека (векторы на основе ВИЧ). Векторные системы, полученные на основе лентивирусов и аденоассоциированных вирусов, способны интегрировать трансген-экспрессирующую кассету с геномом клеток-мишеней. Псевдотипирование векторов с гликопротеинами оболочки вируса бешенства придает им способность ретроградно транспортировать трансгены по нейрональным аксонам в ЦНС. Для изменения тропизма векторных систем исследователями используются несколько приемов: физический таргетинг, заключающийся в покрытии вирусной частицы специальной оболочкой, изменяющей ее природный тропизм и делающей ее неузнаваемой для иммунной системы человека; и генетическая модификация вируса, предполагающая модификацию белков оболочки вектора. Повышение эффективности транскрипции трансгена в клетке-мишени достигается путем транскрипционного таргетинга, предполагающего введение в трансген-экспрессирующую кассету специфических для данных тканей промоторных последовательностей.

Ключевые слова: экспрессия генов, искусственная вирусная векторная система, генная терапия, векторы на основе аденоассоциированного вируса, лиссавирусные гликопротеины, нейрональный генный перенос, векторы на основе РНК-вирусов, векторы для переноса генов, генный таргетинг, векторы на основе ампликона HSV-1, лентивирусные векторы, онколитические поксвирусы.

Библиографическое описание: Супотницкий М.В. Генотерапевтические векторные системы на основе вирусов // Биопрепараты. – 2011. – № 3. – С. 15–26.

The main objects of performing the expertise of the possibility of medical application of genetic constructions based on viruses, developed for inserting genes into human genome, are structures derived by biotechnologies, imitating virus particle behavior, but not causing infectious process. They content of viral proteins, forming the particle's coat, able to recognize target-cells and to internalize into cytoplasm; and transgene expression cassettes, performing longtime expression of one or more genes after being delivered to a cell. In gene therapy of hereditary and infectious diseases vector systems based on lentiviruses, adenoviruses, adeno-associated viruses, orthopoxvirus, herpesviruses and single RNA-viruses, which do not relate to retroviruses are widespread. The achieved level of gene engineering allows to create vector systems, aimed at different cell types and parts of human genome (vectors, based on HIV). Vector systems, derived based on lentiviruses and adeno-associated viruses are able to integrate transgene expression cassette into target cells genome. Pseudotyping of vectors with lyssavirus glycoproteins coat provides them with a capability to retrograde transportation of transgenes to CNS by neuronal axons. For the purpose of changing vector systems tropism the scientists use few methods: physical targeting, which means covering virus particle with a special coat, changing it's natural tropism and making it incognoscible for human immune system; and virus genetic modification, which means modifying proteins of vector cover. Increasing of transgene transcription efficacy in a target-cell is performed by transcriptional targeting, which means inserting specific for the given tissues promotor sequences into transgene expression cassette.

Key words: expression of genes, artificial virus vector systems, gene therapy, adeno-associated virus vectors, lyssavirus glycoproteins, neuronal gene transfer, RNA virus vectors, gene transfer vector, gene targeting, HSV-1 amplicon vectors, lentiviral vectors, oncolytic poxvirus.

Bibliographical description: Supotnitskiy M.V. Genotherapeutic vector systems based on viruses // Biopreparats (Biopharmaceuticals). – 2011. – No. 3. – P. 15–26.

Для корреспонденции:

Супотницкий М.В. – начальник отдела научно-методического обеспечения экспертизы МИБП ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздравсоцразвития РФ.
Адрес: ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздравсоцразвития РФ, 119002, Москва, пер. Сивцев Вражек, 41, mikhaile.supotnizky@yandex.ru
Статья поступила 08.08.2011 г., принята к печати 25.08.2011 г.

Генная терапия наследственных и инфекционных болезней предполагает доставку генов в клетки-мишени. Но ни ДНК, ни РНК не могут быть использованы в «голом виде» для достижения этой цели. Сахарофосфатный остов молекул нуклеиновых кислот располагается по их периферии полярными группами наружу, придавая им анионные свойства. При физиологических значениях pH нуклеиновая кислота несет отрицательный заряд, отталкивающий ее от отрицательно заряженной наружной поверхности клеточной мембраны. Еще одно ограничение при проникновении в клетку нуклеиновой кислоте создает ее гидрофильность. Все ее гидрофобные основания «повернуты» вовнутрь молекулы, поэтому она не может проникнуть через гидрофобный барьер клетки-мишени. В сыворотке крови нуклеиновая кислота быстро деградирует под воздействием нуклеаз. Период полужизни немодифицированной interfering РНК в сыворотке крови укладывается в 5 – 60 мин, для ДНК – он составляет не более 10 мин. Кроме того, нуклеиновые кислоты не способны специфически узнавать клетки-мишени [25]. Поэтому для доставки генов в эукариотические клетки, с начала 1980-х гг. разрабатываются векторные генетические конструкции. В настоящее время сформировалось два альтернативных направления их создания – на основе вирусов и на основе искусственных векторных систем. Цель работы – анализ подходов к конструированию генотерапевтических векторных систем на основе вирусов. Данная публикация представляет собой начало цикла статей, посвященных способам и средствам, используемым при доставке генов в геном человека в рамках технологий генной терапии наследственных и инфекционных болезней.

Ретровирусные векторные системы. Ретровирусы относятся к группе вирусов, РНК-геном которых в инфицированных клетках конвертируется в ДНК. Геном ретровирусов включает три структурных гена, обозначенные как *gag*, *pol* и *env*, фланкированных элементами, названными длинными терминальными повторами (LTR, viral long terminal repeat). В LTR содержатся регуляторные элементы, выполняющие важные функции в жизненном цикле ретровируса. Эти повторы необходимы для интеграции ДНК копии генома вируса с геномом хозяина. Они определяют, где начало и где конец вирусного генома. LTR также служат энхансер-промоторными последовательностями, т.е. они контролируют экспрессию генов вируса. Большой геном ретровирусов облегчает генетические манипуляции.

После инфицирования клетки-мишени копия ретровирусной ДНК интегрируется с ее геномом строго определенным образом. Практически все инфицированные клетки способны экспрессировать гены, привнесенные вирусом. Мощные транскрипционные энхансеры существенно повышают уровень экспрессии генов, клонированных в клетках различных типов. С их помощью можно переместить до 8 т.п.о., что в большинстве случаев более чем достаточно для синтеза крупномолекулярных белков. Весьма удобным для исследователя является то обстоятельство, что ретровирусные векторы можно размножать, достигая их высокой концентрации в небольшом объеме – более 10^9 вирусных частиц/см³. В опытах по инфицированию ретровирусами мозга, печени, мышц, глаз или клеток панкреатических островков грызунов показана устойчивая экспрессия трансгенов в течение более 6 мес. [9]. Ранние этапы жизненного цикла ретровирусов и векторов на их основе показаны на рис. 1.

Векторы на основе ретровирусов с самого начала их разработки предназначались для введения через неповрежденные

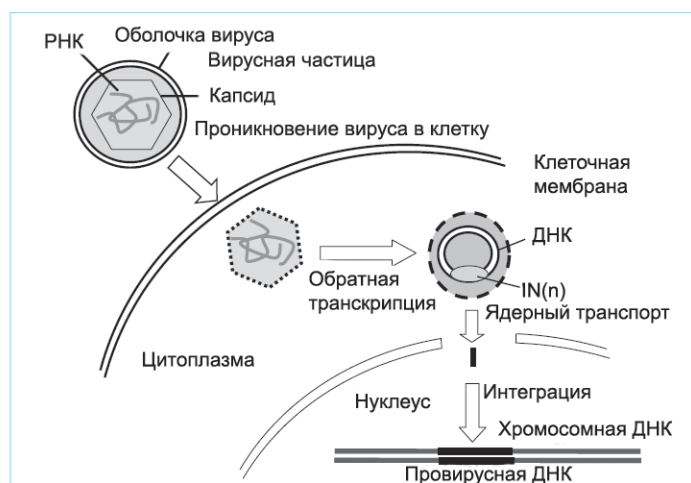


Рис. 1. Ранние этапы жизненного цикла ретровирусов и векторов на их основе. Проникновение ретровируса в клетку сопровождается освобождением капсида от его оболочки и началом синтеза двуцепочечного ДНК-генома (провируса) на матрице вирусной РНК с помощью РНК-зависимой ДНК-полимеразы (обратной транскриптазы), входящей в состав вирусного нуклеокапсида. Затравкой (праймером) этой многоступенчатой реакции служит клеточная тРНК (для большинства MuLV – пролиновая тРНК), комплементарная PBS-участку, расположенному в 5'-концевой части вирусной РНК. Конечным продуктом полимеразной реакции является двуцепочечный ДНК-провирус, содержащий все вирусные гены и фланкированный 3'- и 5'-LTR. Вирусная ДНК, интегразы (IN) и отдельные вирусные и клеточные белки образуют вирусный преинтеграционный комплекс, который импортируется во внутрь ядра. IN катализирует интеграцию вирусной ДНК с ДНК генома клетки. По [18].

клетки за счет механизмов слияния, обеспечиваемых поверхностными белками оболочки вируса. Чувствительность дыхательного эпителия к ретровирусным инфекциям подразумевает возможность ингаляционного пути введения в организм человека векторных конструкций на основе ретровирусов. Сравнение свойств наиболее распространенных генотерапевтических векторных систем приведено в табл. 1.

Критическим ограничением использования гамма-ретровирусных векторов в генотерапевтических процедурах является их неспособность инфицировать неделящиеся клетки, т.е. ткани мышц, мозга, лёгких и печени. Вирусный преинтеграционный комплекс этих векторов, ответственный за интеграцию вирусной ДНК в геном клетки, имеет слишком большие размеры, чтобы проникать через поры в оболочке клеточного ядра. Такая возможность ему предоставляется только при дезагрегации оболочки клеточного ядра во время митоза. В качестве других недостатков специалисты отмечают генетическую нестабильность гамма-ретровирусных векторов, проявляющуюся делециями или точковыми мутациями. Способностью проникать через поры мембраны ядра без митоза, обладают представители другого семейства ретровирусов – лентивирусы [14].

Лентивирусы инфицируют как делящиеся, так и не делящиеся клетки. Наиболее изученным лентивирусом является ВИЧ. Он рассматривается как потенциальный вектор для переноса генов в условиях *in vivo*. Подобно простым ретровирусам, геном ВИЧ включает гены структурных белков *gag*, *pol* и *env*, и гены шести регуляторных белков, названных *tat*, *rev*, *vpr*, *vpu*,

Пакующая система работает следующим образом. Введенная в пакующие клетки в составе плазмиды (packaging vector plasmid) пакующая кассета под контролем промотора цитомегаловируса (CMV-промотора) экспрессирует гены ВИЧ, необходимые для формирования инфицирующей вирусной частицы. Но из кассеты исключен ген *env*, кодирующий белки-предшественники оболочки ВИЧ (Env), определяющие его способность выходить за пределы клетки. Первые лентивирусные векторные системы, разработанные в 1996 г., содержали в пакующих кассетах гены регуляторных белков ВИЧ (*Vpr*, *Vpr*, *Vif*, *Nef*, *Rev*, *Tat*). При дальнейшем усовершенствовании векторной системы из пакующих кассет были удалены гены регуляторных белков ВИЧ, LTR, а также последовательности, кодирующие пакующий сигнал (Ψ) и праймерсвязывающий сайт (PBS). Это позволяло избежать случайную упаковку полной мРНК ВИЧ в вирусную частицу. Векторы второй генерации включали только гены *Tat*- и *Rev*-белков. Третья (современная) генерация пакующих систем включает обычно две плазмиды: одна кодирует *Gag*- и *Gag-pol*-белки (*Gag* формирует сердцевину ВИЧ, *Pol* – его ферментную систему соответственно); вторая – *Rev*-белок (избирательно активирует синтез структурных белков вируса и обеспечивает экспорт из ядра длинных молекул вирусной РНК).

Векторная плазида (transfer vector plasmids) содержит кассету, экспрессирующую мРНК, включающую все *cis*-активирующиеся элементы и последовательности, кодирующие пакующий сигнал. Такие плазмиды содержат трансген-экспрессирующую кассету с геном, предназначенным для экспрессии в новом хозяине, и находящимся под контролем внутреннего промотора, обычно позиционированного между 3'-*Tat/Rev* SA-сайтом и 3'-LTR. Для формирования оболочки векторной вирусной частицы в систему включен **оболочечный вектор** (envelope vector). Он содержит кассету, определяющую синтез гликопротеинов оболочки вируса. Образующиеся в таких системах вирусные частицы являются своего рода инфекционным ретровирусом одноразового действия. При заражении ими клеток-мишеней, не содержащих экспрессирующийся ретровирусный провирус, способный выполнять транс-функции, осуществляется тот же порядок событий, что и при заражении обычным вирусом вплоть до образования интегрированного провируса. Однако, так как вектор не содержит структурных вирусных генов *gag*, *pol* и *env*, образования вирусных частиц не происходит. Клетки-мишени, содержащие экспрессирующийся интегрированный вектор, не могут передавать незараженным клеткам гены по горизонтали, приобретенные в составе вектора. В то же время интегрированный вектор передается дочерним клеткам по наследству, т.е. по вертикали. Поскольку процесс переноса генов с помощью рекомбинантных ретровирусных частиц заканчивается на клетках-мишенях, а вирусный вектор не распространяется дальше, подобно тому, как это происходит в случае репликационно-компетентных вирусов, то принято говорить не об инфекционном переносе, а о трансдукции генов в составе вектора [1]. Схема переноса генов с использованием ретровирусных векторов показана на рис. 3.

Ретровирусные (лентивирусные) векторы можно **перенацеливать на разные типы клеток и разные участки генома человека**. Первая задача решается благодаря псевдотипированию вируса. Смысл этого методического приема в следующем. Так как из лентивирусной векторной системы удален ген *env* ВИЧ, то оболочечный вектор (см. выше) может содержать ген, направляющий синтез гетерологичного гликопротеина. Он включается в частицы вируса пакующей системой вместо собственного гликопротеина. Такие вирусы называют псевдотипированными (pseudotyping) или вирусами-обманщиками. Они имеют ряд преимуществ перед ВИЧ, если рассматривать их с точки зре-

ния использования в качестве векторных систем: 1) увеличивают безопасность вектора вследствие удаления последовательностей, гомологичных вирусу дикого типа; 2) расширяют или изменяют тропизм векторного вируса в отношении клеток-мишеней; 3) улучшают стабильность синтезированных вирусных частиц на этапах концентрирования, хранения и применения. В зависимости от используемого в пакующей системе гликопротеина, формируются различные псевдотипы вируса [17].

Например, химерный гликопротеин RD114, полученный благодаря слиянию трансмембранного и внеклеточного доменов гликопротеина эндогенного ретровируса кошачьих (feline endogenous virus RD114) с цитоплазматическим доменом гликопротеина амфотропного вируса MLV 4070A¹, позволяет псевдотипированному вектору эффективно трансдуцировать мезенхимальные стволовые клетки (mesenchymal stem cells, MSCs) с очень низкой цитотоксичностью [31].

Лентивирусные векторы, псевдотипированные с гликопротеинами оболочки вируса бешенства (PV-штамм), приобретают тропность к нейрональной ткани и способность к ретроградно-

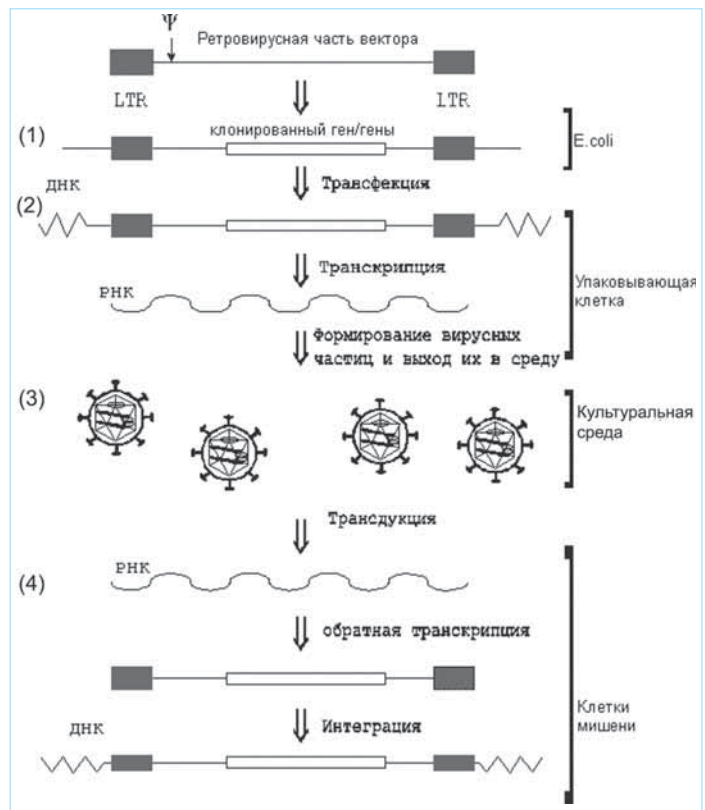


Рис. 3. Схема переноса генов с использованием ретровирусных векторов.

1. Клонирование гена в ДНК ретровирусного вектора (transfer vector plasmids – см. рис. 2) с помощью стандартных генно-инженерных методов. На данном этапе вектор ведет себя как обычный плазмидный вектор. Амплификация ДНК вектора и селекция осуществляются в клетках *E. coli*.

2. Перенос высокоочищенной ДНК ретровирусного вектора в упаковывающие клетки.

3. Формирование ретровирусных частиц и их выход в культуральную среду. Сбор культуральной среды упаковывающих клеток, концентрирование ретровирусов.

4. Трансдукция гена в составе ретровирусного вектора в клетки-мишени. По [1].

¹ Амфотропный вирус — вирус, для которого характерен более широкий круг хозяев, чем это в норме свойственно вирусам данного вида.

Таблица 2. Клетки и органы — мишени для псевдотипированных лентивирусов*

Мишень	Гликопротеин	Преимущество
Печень	VSV-G	Снижена токсичность вектора
	LCMV	Снижена токсичность вектора, уменьшена воспалительная реакция на его введение
	RRV	Приобретен тропизм к клеткам печени, не являющимся гепатоцитами — Купферовым клеткам
	SeV-F	
Легкие	Гликопротеины вируса Эбола	Трансдукция апикальной поверхности эпителия дыхательных путей
	Гликопротеины вируса Марбурга	
	SeV-F и HN	
	JSRV	
Островки Лангерганса поджелудочной железы	LCMV	Снижена токсичность вектора
ЦНС	VSV-G	Нацеливание вектора преимущественно на нейроны
	LCMV	Нацеливание вектора на астроциты
	Вирус бешенства	Нацеливание вектора на предшественники/стволовые клетки нейрональной ткани
	Вирус Mokola (один из членов семейства <i>Lyssavirus</i> , вызывающих бешенство)	Ретроградный транспорт вектора из периферической нервной системы в ЦНС Ретроградный (от синапса к телу нейрона) и антиретроградный (от тела нейрона к синапсу) транспорт вектора в пределах ЦНС
Сетчатка глаза	VSV-G	Трансдукция фоторецепторов и ретинального пигментного эпителия
	Вирус Mokola	Специфичность ограничена ретинальным пигментным эпителием
Миоциты/мышцы	Вирус Mokola	Трансдукция кардиомиоцитов плода (<i>in utero</i>)
	Вирус Эбола	То же
Гематопозитическая система	RD114	Более эффективен и менее токсичен, чем VSV-G
	GALV	Увеличение стабильности вектора в сыворотке
Раковые клетки	GALV	Веретенообразный (<i>fusogenic</i>) гликопротеин
	LCMV	Избирательность для клеток глиомы

* По [4].

му транспорту в условиях *in vivo*. Введенный в периферическом участке нервной системы псевдотипированный лентивирусный вектор по нейрональным аксонам доставил трансгены в ЦНС [6]. Подробно стратегия использования таких векторов для целей генотерапии, описана в работах [4, 7, 17, 27]. В табл. 2 обобщены сведения по мишеням псевдотипированных лентивирусов.

Нацеливание вектора на клетку еще не означает транскрипции доставленного в эту клетку гена. Для того чтобы транскрипция трансгена в клетке-мишени была эффективной, генотерапевтами разработаны методы транскрипционного таргетинга (*transcriptional targeting*), предполагающие введение в такие векторы специфических для данных тканей промоторных последовательностей. Примеры таких промоторов, используемых в тканеспецифических лентивирусных векторах, приведены в табл. 3.

Перенацеливание ретровирусных векторов с одних участков генома человека на другие стало возможным благодаря выяснению механизмов интеграции провируса с геномом человека.

Интеграция ретровирусной ДНК с геномом клетки-мишени катализируется вирусным ферментом — интегразой (см. рис. 1). Однако этот фермент не специфичен и интеграция провируса не носит специфический характер. Тем не менее, у различных ретровирусов обнаружены «предпочтения» в сайтах для интеграции провирусной ДНК. По таким предпочтениям ретровирусы можно разделить на три группы. К первой относятся ВИЧ-1, ВИЧ-2, SIV и FIV. До 70% ДНК их провирусов интегрируются с функционирующими генами (*transcription units*). Вторая группа включает MLV и FV. Они «предпочитают» 5'-концы транскрипционных единиц и CpG-островки. Третья группа представлена ретровирусами ASV, HTLV-1 и MMTV – у них не обнаружено никаких «предпочтений» [18].

О том, какое значение имеет участок интеграции провируса в развитии неинфекционной патологии, говорит накопленный опыт применения ретровирусных векторов для лечения детей с X-связанным тяжелым комбинированным иммунодефицитом (X-linked severe combined immunodeficiency, SCID-X1).

Таблица 3. Селективные тканеспецифические промоторы, используемые в лентивирусных векторах*

Ткань-мишень	Промотор	Источник промотора	Свойство, приобретенное вектором
Ретинальная ткань	Мышиный CD44	Ген, кодирующий трансмембранный гликопротеин и клеточный поверхностный рецептор для гиалуроновой кислоты	Активен в глиальных мюллеровских клетках (glial Müller cells)
	Человеческий и мышиный GFAP	Ген, кодирующий человеческий и мышиный глиальный фибриллярный кислый белок	Активен в глиальных мюллеровских клетках
	Мышиный VIM	Ген, кодирующий виментин (vimentin) — главный субъединичный белок промежуточных нитей соединительных тканей и других тканей мезодермального происхождения	То же
	IRPB1783	Ген, кодирующий интерфоторецепторретиноидсвязывающий белок	Активен в колбочках сетчатки глаза
	GCAP292	Ген, кодирующий гуанилциклазоактивирующий белок 1	То же
	mOP500	Ген родопсина	Активен в палочках сетчатки глаза
Нервная ткань	CamKII	Ген, кодирующий кальций/кальмодулин-зависимую протеинкиназу II	Активен в нейронах переднего мозга взрослого человека
	SYN	Ген синапсин 1-фосфопротеина	Активен в отдельных регионах гиппокампа
	NSEp	Ген, кодирующий нейронспецифическую энлазу	Активен в стриатуме (полосатое тело) и гиппокампе
	GfaABC1D	Ген глиального фибриллярного кислого белка	Активен в глии ЦНС
Бета-клетки	Инсулин	Ген инсулина человека	Активен в бета-клетках и линиях клеток мышиной инсулиномы
Печень	ALB	Ген альбумина	Активен в гепатоцитах
	ET	Синтетический промотор	Более активен, чем ALB; минимальная активность в селезенке
	ApoA-II	Ген человеческого аполипопротеина A-II	Индукцибелен
	α 1-AT	Ген человеческого α 1-антитрипсина	Активен в гепатоцитах
Система кроветворения	WASp	Ген, кодирующий белок Wiskott-Aldrich-синдрома	Активен в Т-клетках, В-клетках дендритных клеток
	Tie2	Ген, кодирующий расположенный на поверхности клетки рецептор ангиопоэтина	Активен в эндотелиальных клетках и моноцитах
	Промоторы: анкирин-1, α -спектрин, β -глобин, ζ -глобин; энхансеры: GATA-1, β -глобин LCR, интрон I8, α -глобин HS40, γ -глобин интрон	Эритроид-специфические гены	Активен в эритроидных линиях
	HLA-DR α	Ген, кодирующий альфа-субъединицу человеческого лейкоцитарного антигена DR	Активен в антигенпрезентирующих клетках
	proximal <i>Ick</i>	Ген, кодирующий специфический Т-клеточный протоонкоген, <i>Ick</i>	Активен в Т-клетках
Сердце	ANF	Ген, кодирующий человеческий атриальный натрийуретический фактор	Активен в кардиомиоцитах
	MLC2v	Ген, кодирующий легкую цепь человеческого вентрикулярного миозина	Активен в кардиомиоцитах
Легкие	SP-C	Ген сурфактантного белка С второго типа альвеолярных эпителиальных клеток (AT-2 клетки)	Активен в AT-2 клетках
Простата	PSAp	Ген, кодирующий специфический антиген простаты	Не известно

*По [17].

Например, у четырех детей из одиннадцати, которым в терапевтических целях вводили вектор на основе MLV, развилась Т-клеточная лейкемия. В последующем было установлено, что, по крайней мере, у двух детей клональная экспансия Т-клеток была вызвана вставкой вектора в *Lin-1*-, *Isl-1*-, *Mes-3*(LIM)-домены протоонкогена *only-2* (LMO2) и его активацией через энхансеры вектора, содержащиеся в LTR [8].

В первом десятилетии текущего века наиболее распространенным подходом к нацеливанию ретровирусного вектора на участки в геноме человека было использование в составе вирусной частицы слитых белков, образующих вирусный преинтеграционный комплекс, импортирующий его в ядро нуклеуса. Такие белки включают IN-белок, полученный из ВИЧ-1 или ASV; и ДНК-связывающие последовательности клеточных и бактериальных белков, слитых с N- или С-концом IN. Что бы вирус не утратил инфекционности, слитые белки вводят в вирион ВИЧ-1 вместе с исходным IN (wild-type IN). Одна из используемых моделей нацеливания ретровирусных векторов на конкретные участки ДНК в геноме человека (таргетинговой интеграции), показана на рис. 4.

Для увеличения специфичности геномного таргетинга, белок интегразы (IN) был слит с полидактил-цинк-пальчиковым белком E2C (polydactyl zinc finger protein E2C), связывающимся с уникальной последовательностью в геноме человека размером 18 т.п.о. Вирус, содержащий белок E2C, слитый с С-концом IN, в семь раз чаще интегрировался с хромосомой вблизи E2C-связывающего сайта, чем исходный. Этот же белок, слитый с N-концом IN, показал более чем десятикратное предпочтение в интеграции с E2C-связывающим сайтом, чем исходный IN [18]. И хотя эффективность таргетинговой интеграции пока ниже, чем у вирусов с диким типом IN, эти эксперименты свидетельствуют о сформировавшемся направлении таких исследований, способном серьезно повлиять на технологии соматической генотерапии.

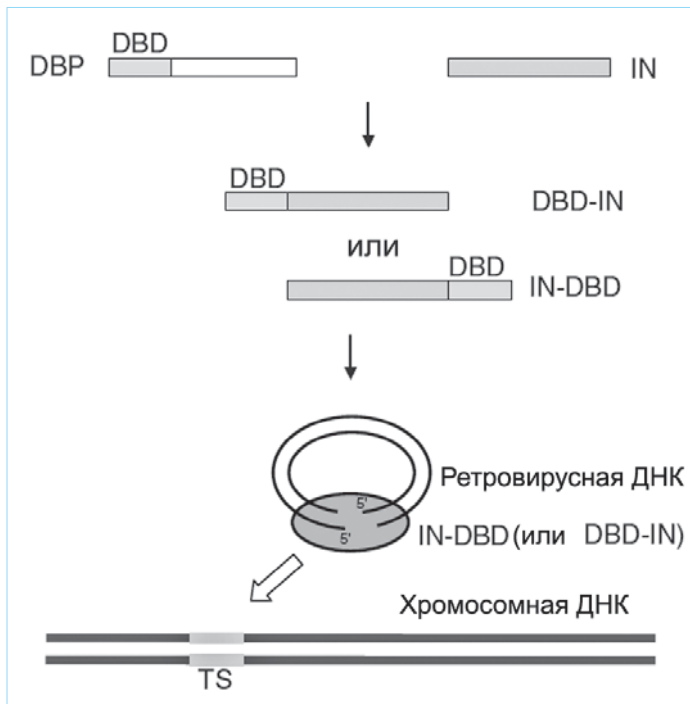


Рис. 4. Модель таргетинговой интеграции ретровирусных векторов. Интеграция осуществляется посредством использования модифицированной интегразы, слитой с гетерологичными ДНК-связывающими доменами. DBD – ДНК-связывающий домен (DNA-binding domain); IN – интегразы. TS – белок, образовавшийся в результате слияния DBD и IN. Преинтеграционный комплекс интегрируется с участком хромосомной ДНК (target site, TS), узнаваемым DBD. По [18].

В последние годы в практике генной терапии стали использовать лентивирусные векторы, дефицитные по интегразе (integration-deficient lentiviral vectors, IDLVs). Их геном содержит мутантный ген IN, продукт которого не способен обеспечить интеграцию лентивируса с геномом человека. Вектор поддерживается в трансдуцированной клетке в виде кольцевой эписомы, не имеющей репликационного сигнала. В процессе деления клетки эписома утрачивается, однако стабильно сохраняется в неделящихся клетках. Такие векторы считаются более безопасными, чем интегрирующиеся (рис. 5).

Однако вызывает серьезное опасение неоднозначность целей подобных исследований. Помимо изоционности в «нацеливании» лентивирусных векторов на клетки и органы-мишени, и, даже, на участки генома человека, критические для его здоровья, для получения псевдотипированных лентивирусов, используются гликопротеины оболочки вирусов, считающиеся потенциальными агентами биологического оружия (вирусы геморрагических лихорадок Эбола, Марбурга, Росс-Ривер и др.). Последнее свидетельствует о том, что работа с лентивирусными векторами, предназначенными для лечения редких наследственных болезней у обывателей-инвалидов, ведется в лабораториях по уровню биологической безопасности пригодных для исследования традиционных агентов биологического оружия. Одновременно проводятся эксперименты по изучению возможности массового применения таких конструкций, например, путем их использования в аэрозолированном состоянии (см. опыты по трансдукции апикальной поверхности эпителия дыхательных путей; табл. 2).

К июню 2011 г. 20,5% протоколов экспериментов по генной терапии в мире (из 1714) предполагали использование векторов на основе ретровирусов. Их по популярности среди генных терапевтов «перегнали» только векторы на основе аденовирусов – 23,7% (www.wiley.co.uk/genmed/clinical/).

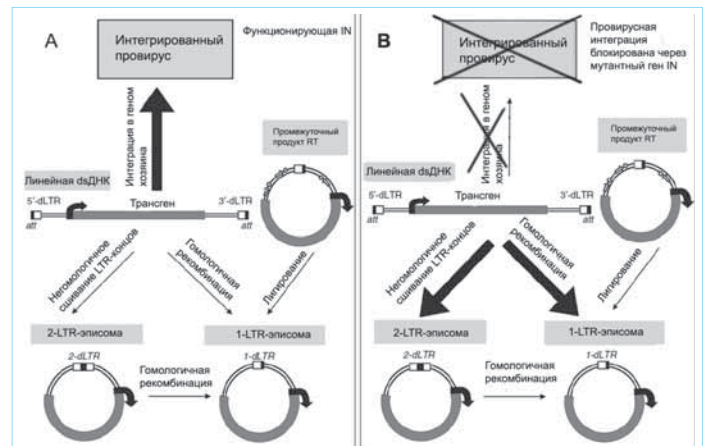


Рис. 5. Образование эписомы из лентивирусного вектора. В результате обратной транскрипции РНК-вектора в клетке формируется линейная двуцепочечная ДНК (linear double-stranded DNA, dsDNA) с LTR на обоих концах. У самоинактивирующихся векторов LTR содержат делеции в U3-регионе (на схеме показана как dLTR). Эта ДНК импортируется в ядро как часть вирусного преинтеграционного комплекса. **А.** Традиционный лентивирусный вектор, включающий функционирующую IN, интегрируется с геномом как провирус. Однако в клетке он может поддерживаться и в кольцевой форме. Для этого у линейной двуцепочечной ДНК провируса есть, по крайней мере, две возможности: через негомологичное сшивание LTR-концов, образуя 2-LTR-эписому; или через лигирование «ников» (молекул с односторонними разрывами – показаны стрелками с кружками) – образуя 1-LTR-эписому. **В.** Когда провирусная интеграция блокирована через мутантный IN, в ядре клетки возрастает количество векторных эписом. По [28].

Таблица 4. Тропизм аденовирусов различных субгрупп *

Субгруппа	Серотип	Преобладающий тропизм	Известные рецепторы узнавания
A	12, 18, 31	ЖКТ	CAR
B1	3, 7, 16, 21, 50	Респираторная система	CD46, CD80/86, рецептор X, HSPG
B2	11, 14, 34, 35	Почка	CD46, CD80/86, рецептор X, HSPG
C	1, 2, 5, 6	Респираторная система	CAR, HSPG, MHC-I, VCAM-I, интегрин
D	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22 – 30, 31, 33, 36 – 39, 42 – 49, 51	Ткани глаза	CAR, сиаловые кислоты, CD46
E	4	Респираторная система, ткани глаза	CAR
F	40, 41	ЖКТ	CAR

* По работам [22, 26].

Векторные системы на основе аденовирусов. Аденовирусы – ДНК-вирусы, способные инфицировать оба типа клеток (делящиеся и неделящиеся), включая клетки печени, легких и эпителия. Они реплицируются в ядре инфицированной клетки как эписомные (экстрахромосомные) элементы. По связыванию со специфическими сыворотками аденовирусы разделены на 51 серотип. На основе их способности агглютинировать эритроциты у людей, кроликов и мышей; и по онкогенности для грызунов их подразделяют еще на 6 подтипов или субгрупп (от А до F). Исследование филогении аденовирусов дает дополнительные основания для их деления внутри субгрупп. Субгруппа В дополнительно разделена на субгруппы В1 и В2 [23]. Аденовирусы разных субгрупп поражают различные органы и ткани человека. Например, вирусы субгрупп В1, С и Е главным образом вызывают респираторные болезни. Вирусы субгрупп В, D и Е способны поражать ткани глаза. Субгруппа вирусов F вызывает гастроэнтериты. Вирус субгруппы В2 инфицирует почки и мочевой тракт [21]. В табл. 4 обобщены сведения по тропизму аденовирусов различных субгрупп.

Исследования по созданию на основе аденовирусов векторов, предназначенных для использования в целях генотерапии, активизировались с начала 1990-х гг. Этому способствовали следующие обстоятельства:

1) ДНК-вирусы рассматривались исследователями как более простые объекты для генно-инженерных манипуляций, чем вирусы с РНК-геномом;

2) ДНК-вирусы реплицируются в неделящихся клетках, например, клетках мышц.

Конструирование векторов на основе аденовирусов во многом повторяло путь, пройденный создателями лентивирусных векторов. Дефектные по репликации аденовирусы получали посредством замены гена *E1*, который необходим для репликации, на ген, представляющий интерес для исследователя и энхансер-промоторный элемент. Такие рекомбинантные векторы способны эффективно размножаться в пакующих клетках, экспрессирующих продукт гена *E1*, давая более 10^{11} – 10^{12} аденовирусных частиц/см³ [9]. Аденовирусные векторы, неспособные к репликации вне пакующих клеток с геном *E1*, используют для введения трансгенов в условиях *in vivo*. Они обеспечивают очень высокую экспрессию клонированных генов, но на непродолжительное время (5 – 10 сут) из-за противодействия иммунной системы реципиента. Возможно также и то, что клетки-мишени содержат факторы, которые усиливают синтез аденовирусных белков, приводящих к иммунному ответу. Для того чтобы обойти эту проблему, было предложено второе поколение аденовирусных векторов, у которых дополнительно к гену *E1* удалили гены, обеспечивающие репликацию вируса. Такие векторы способны к более длительной экспрессии генов, доставленных в клетку – до 40 сут [9]. Это направле-

ние исследований получило дальнейшее развитие созданием третьего поколения аденовирусных векторов («third generation») – «выпотрошенных (gut-less)» векторов, из которых были удалены все вирусные гены и оставлены только элементы, определяющие начало и конец генома, и вирусную пакующую последовательность. Их емкость для клонируемой ДНК – до 35 т.п.о. [26]. Трансгены, переносимые такими векторами, экспрессировались в течение 84 сут [9]. При экспрессии аденовирусными векторами чужеродных генов могут использоваться эукариотные промоторы, такие как аденовирусный *Ela*-промотор, прямой ранний промотор цитомегаловируса, или LTR-промотор вируса саркомы Рауса [21]. Основные усилия разработчиков таких векторов направлены на: 1) преодоление иммунитета к аденовирусам, имеющегося практически у каждого взрослого человека; 2) изменение тропизма вектора и более точное его нацеливание на клетки-мишени.

При разработке аденовирусных векторов, способных преодолевать иммунитет к аденовирусам, обычно исследователями учитывается то, что у людей наиболее часто встречается антитела к аденовирусу пятого серотипа (Ad5-антитела). Векторы, производные от аденовирусов других серотипов, способны избежать нейтрализации этими антителами (см. табл. 4). Реже всего у людей обнаруживают антитела к аденовирусу 35-го серотипа. Гены, трансдуцированные экспериментальным животным векторами на основе вируса 35-го серотипа, способны длительно экспрессироваться, несмотря на присутствие антител к вирусу 5-го серотипа [29].

В связи с тем, что вектор в любом случае должен формировать вирусную частицу, способную узнавать «нужный» рецептор на поверхности клетки-мишени, бесконечно «упрощать» вирус и пакующую систему невозможно. Поэтому в последние годы для снижения «заметности» вируса иммунной системе, стали использовать более тонкие подходы. Например, введение точечной мутации в петлю гексонового белка AdC-вектора, отвечающую за эпитоп доминирующих нейтрализующих антител. Мутация значительно снижала способность вектора связываться с нейтрализующими антителами в условиях *in vitro*, но в условиях *in vivo* он блокировался специфическими антителами [16]. Замена всей гексоновой петли вируса AdHu5 на такую же петлю из вируса AdHu48, предотвращает связывание вектора AdHu5-нейтрализующими антителами и позволяет эффективно использовать этот вектор для переноса генов в геном животных, в крови которых уже имеются антитела к AdHu5 [19].

Для изменения тропизма аденовирусных векторов исследователями используются две стратегии: физический таргетинг

Таблица 5. Стратегии изменения тропизма аденовирусных векторов*

Вектор	Модификация вектора	Причины изменения тропизма вируса	Тип клеток, использованных в экспериментах	Результат
Ad5-pk7	Введение полилизинового мотива (pK7) в «набалдашник» капсида HAd5	Повышенное содержание SPG на поверхности раковых клеток, способствует повышению трансдукции	Клетки глиомы человека, пересаженные мышам	Повышенные трансдукция и экспрессия маркера
Ad5/3-RGD	Введение в набалдашник капсида HAd5, последовательности из «набалдашника» HAd3, содержащей RGD-домен	Повышение трансдуцирующей способности вектора в отношении раковых клеток с высоким уровнем экспрессии трансдуцированного гена	То же	1000-кратное увеличение инфективности
CAV-2 (Ad собак)	Изменение тропизма вектора	Использование альтернативных рецепторов	<i>In vivo</i> – респираторный тракт мышей, <i>ex vivo</i> – пульмонарный эпителий человека	Эффективная трансдукция пульмонарного эпителия, «ускользание» от антител к HAd5, незначительная воспалительная реакция вместе введения вектора
HAd5	mEGF-полимерная оболочка	Селективная трансдукция раковых клеток, богатых EGFR	Перитонеальная модель ксенотрансплантатов овариальных раковых клеток человека у мышей	Ограниченные векторный тропизм и токсичность. Повышенная антираковая эффективность
HAd5	Биспецифические антитела (Ab), нацеливающие «набалдашник» капсида HAd на эндолгин человека	Биспецифические антитела соединяют Ad с васкулярным эндолгином в ангиогенных зонах опухолей	Преимущественно эндотелиальные клетки и HUVEC-клеточные линии	Повышенная селективность и CAR-независимая трансдукция HUVEC

* По [26].

(physical targeting) и генетическая модификация вируса. Кратко они обобщены в табл. 5.

Физический таргетинг заключается в том, что вирусная частица покрывается специальной оболочкой, изменяющей ее природный тропизм и делающей ее неузнаваемой для иммунной системы. В качестве такой оболочки используют полимеры (полиэтиленгликоль или poly-[N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide, рНРМА]) или вирусную частицу включают в биодegradируемую альгинатную микрокапсулу. Природный тропизм вектора заменяется селективным таргетингом (selective targeting), т.е. в эти полимеры вводятся различные таргетирующие лиганды (пептиды, белки или антитела). Другой эффективной стратегией для физического таргетинга аденовирусного вектора стало использование биспецифических адапторных молекул (биспецифические антитела или белки слияния), состоящих из двух компонентов – один из них с высокой специфичностью связывается волокнистым набалдашником (fiber knob) капсида аденовируса, другой – с высокой специфичностью связывает рецептор клетки-мишени. Однако оба подхода дают плохо воспроизводимые результаты. Поэтому физическому таргетингу исследователи сегодня предпочитают генетические модификации аденовируса, т.е. генетический таргетинг [26].

В экспериментах по генетическому таргетингу объектом модификации генно-инженерными способами обычно является волокнистый «набалдашник» капсида, играющий основную роль в специфическом узнавании Ad клеток-мишеней, и, в частности, расположенные на нем два участка: С-конец и HI-петля. Вставка в эти участки RGD или полилизина ведет к повышению инфективности аденовирусного вектора в отношении широкого круга клеток-мишеней, экспрессирующих на своей поверхности интегрин или HSPG. Кроме модификации волокнистого «набалдашника» капсида, для изменения тропизма вектора модифицируются другие оболочечные белки аденовируса: гексон, пентон, pIX или pIII. Другой удачной схемой изменения тропизма аденовирусных векторов, производных от HAd5, стала замена волокнистого «набалдашника» капсида на аналогичную структуру, взятую из вирусов других серотипов, использующих для интернализации иные рецепторы, чем CAR. Этот прием изменения антигенной специфичности вируса близок к псевдотипированию, описанному выше на примере лентивирусных векторов [26].

Серьезным недостатком аденовирусных векторов, ограничивающих их использование в генотерапии, является неспособность к интеграции с хромосомой реципиента, в результате вектор утрачивается по мере продолжения деления клеток. Этот недостаток частично устраняется использованием векторов на основе адено-ассоциированного вируса.

Адено-ассоциированные вирусные векторы. Относительно недавно используемый для генотерапии адено-ассоциированный вирус (AAV) является простым непатогенным одноцепочечным ДНК-вирусом. Два его гена (*cap* и *rep*) расположены между двумя терминальными инвертированными повторами, определяющими начало и конец вируса, и содержат пакующую последовательность. Ген *cap* кодирует оболочечные белки вирусного капсида, а продукт гена *rep* обеспечивает репликацию вируса и его последующую интеграцию с геномом клетки-реципиента. AAV нуждается в дополнительных генах для своей репликации в пакующих клетках. Они обеспечиваются хэлперными вирусами (обычно это аденовирусы или вирус простого герпеса) [9] (рис. 6).

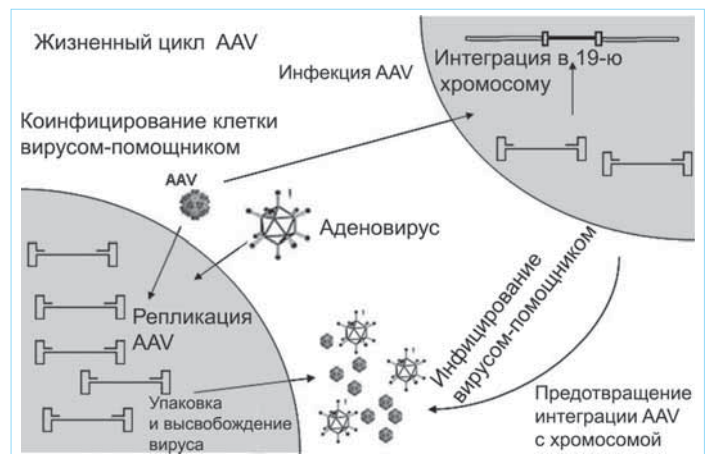


Рис. 6. Жизненный цикл AAV. AAV размножается в клетках, коинфицированных аденовирусом. В отсутствие аденовируса AAV поддерживается в латентном состоянии, интегрировавшись с хромосомой-19 (AAVS1). Латентный AAV может стать репликационно-активным при условии суперинфицирования клетки аденовирусом. По [5].

Трансдукция вектора в клетку-мишень происходит различными путями, включающего интеграцию с геномом хозяина, экспрессию трансдуцированных генов с линейных и кольцевых форм вируса [11], гомологичную [20] и негомологичную рекомбинацию ДНК-вектора с хромосомной ДНК [10]. Для изменения тропизма AAV используют те же приемы, что и для изменения тропизма аденовирусных векторов [5]. Исследования «предпочитаемых» сайтов интеграции AAV с геномом человека показали, что в основном они располагаются в пределах CpG-островков и в начале генов, а его рекомбинация с хромосомной ДНК человека в основном носит негомологичный характер. В отличие от ретровирусного вектора, вектор на основе AAV не содержит интегразу, и он может интегрироваться с хромосомой только при наличии в ее участках одно- и двунитевых разрывов. CpG-островки проявляют себя измененной структурой хроматина и имеют повышенную чувствительность к нуклеазам. В репликации ДНК они участвуют в качестве участков начала репликации с высокой вероятностью появления разрывов в цепи ДНК. Этот феномен объясняет интеграционное предпочтение AAV к CpG-островкам [10].

AAV может инфицировать различные типы клеток. В присутствии продукта гена *rep* вирусная ДНК способна интегрироваться преимущественно с хромосомой-19 человека. В векторах, создаваемых на основе AAV, *rep* и *cap* гены замещаются на трансгены. Выход вирусных частиц составляет ($10^{11} - 10^{12}$) см³. Емкость AAV-векторов не превышает 3,5 – 4,0 т.п.о. чужеродной ДНК, что исключает их использование для клонирования крупных генов. AAV-вектор, содержащий ДНК человеческого фактора IX, был использован исследователями для трансфекцирования печени и мышц иммунокомпетентных мышей. Трансфекцированные клетки продуцировали в кровь мышей терапевтические количества белка фактора IX более 6 мес. [9].

Векторные системы на основе вируса герпеса простого.

Клонированные векторы на основе вируса герпеса простого (herpes simplex virus type 1, HSV-1) имеют простую конструкцию и разработаны хуже, чем векторы на основе аденовирусов. Вирус включает более чем 80 генов, один из которых (*IE3*) может быть замещен с целью создания вектора. Делетированы могут быть и некоторые другие гены, что позволяет использовать вектор для клонирования нескольких трансгенов. Выход вирусных частиц составляет приблизительно ($10^8 - 10^9$) см³. Развитие таких векторов затормозили такие препятствия как: 1) непродолжительная экспрессия клонированных генов (от нескольких суток до недель); 2) их способность вызывать цитопатические эффекты и ответы со стороны иммунной системы. Поэтому развитие получили ампликоны², многократно повторяющиеся последовательности HSV, включающие мономерные последовательности, организованные по типу «голова к хвосту» (конкатемеры). Мономеры включают, по крайней мере, один участок начала репликации вирусной ДНК (*oriS* или *oriL*) и последовательность для упаковки ДНК в вирусную частицу (*pac*). Клонирование этих двух последовательностей в бактериальную плазмиду, позволяет создать вектор, в пакующих системах упаковывающий ДНК в HSV-1 вирион. Такие векторные системы способны упаковывать до 150 т.п.н. чужеродной ДНК, что позволяет одним вектором доставлять в клетку-мишень десятки транскрипционных единиц, и в их числе гены других вирусов, не вызывая иммунных ответов и цитопатических эффектов на сам вектор. Продолжительность экспрессии клонированных генов достигает года. HSV-1 рассматривается

специалистами как основной при конструировании вирусных векторов, предназначенных для генотерапии мозга [24].

Векторные системы на основе ортопоксвирусов. Ортопоксвирусы – крупные вирусы, содержащие двунитевую ДНК. Отдельные виды могут иметь либо очень широкий, либо очень ограниченный круг хозяев. Емкость поксвирусного вектора позволяет включить 25 т.п.н. чужеродной ДНК без делеций генома самого вируса. Векторные системы на их основе не имеют широкого применения из-за того, что эукариотические промоторы неэффективно распознаются транскрипционными механизмами поксвирусов, и для эффективной экспрессии рекомбинантных генов в клетке-реципиенте должны быть использованы поксвирусные промоторы. Кроме того, поксвирусные транскрипты не подвергаются сплайсингу, поэтому генетический материал, клонированный в поксвирусах, должен быть в форме кДНК. Вследствие большого размера и неинфекционной природы поксвирусной ДНК, чужеродные гены клонируются в поксвирусах путем рекомбинации в условиях *in vivo* [2].

Неожиданным для вирусологов стало открытие у ортопоксвирусов природного тропизма к опухолевой ткани. Поэтому в настоящее время их рассматривают в качестве векторов для доставки генов в опухолевую ткань. И в этом аспекте вирус вакцины (*vaccinia virus*) имеет значительные преимущества перед другими вирусами, на основе которых конструируют векторы для генотерапии: 1) у него эффективный жизненный цикл; уже через 6 ч в инфицированной клетке формируются зрелые вирионы; 2) в условиях *in vivo* он быстро распространяется от клетки к клетке; 3) несет свои строгие промоторы, способные обеспечивать высокий уровень экспрессии трансгенов; 4) может инфицировать различные ткани человека, не вызывая патологических процессов [30].

Векторные системы на основе РНК-вирусов, не принадлежащих к семейству ретровирусов. Разрабатываются со второй половины 1990-х гг. в рамках создания новых технологий иммунизации. Для конструирования вакцин используются векторы на основе вирусов гриппа, бешенства, везикулярного стоматита, кори, респираторно-синтициальной болезни, лихорадок Синдбис, Сендай, ВЭЛ и др. Основными преимуществами таких векторных систем являются следующие: 1) в условиях *in vitro* возможно использовать легко селективируемые нецитопатические РНК-векторы; 2) векторы данного типа, содержащие репликон, могут длительное время экспрессировать высокие уровни гетерологичных белков и поэтому они могут рассматриваться как эффективная вакцинная векторная система; 3) векторы данного типа не содержат полного набора вирусных генов и благодаря этому не могут образовывать вирусные частицы, способные вызвать генерализованную инфекцию в других тканях; т.е. эти векторы могут удовлетворять строгим требованиям безопасности; 4) так как компоненты вектора, являющиеся производными вируса, имеют небольшой размер и не экспрессируют структурные белки, то ответ иммунной системы на вектор, вероятно, будет ограниченным. Следовательно, продолжительная экспрессия чужеродных белков, не будет приводить к цитолизу клеток; 5) благодаря тому, что РНК-вирусы утратили ДНК-фазу, они не могут интегрировать чужеродные гены в хромосомную ДНК. Это делает невозможной трансформацию клеток векторами на основе РНК-вирусов [15].

Проведенный анализ подходов к конструированию генотерапевтических конструкций (векторных систем) на основе вирусов показывает, что основным объектом при проведении экспертизы на возможность медицинского применения являются получаемые биотехнологическим путем структуры, имитирующие в организме человека поведение вирусной частицы, но не вызывающие инфекционный процесс. В их состав входят:

² Термин «ампликон» в генетической литературе имеет и другое значение — «амплификат», т. е. ПЦР-продукт, наработанный в процессе реакции.

белки, формирующие оболочку вируса, способную к узнаванию клеток-мишеней и к интернализации в цитоплазму; и трансген-экспрессирующая кассета, осуществляющая длительную экспрессию в клетке одного или нескольких генов. Наибольшее распространение в практике генной терапии наследственных и инфекционных болезней приобрели векторные системы на основе лентивирусов, аденовирусов, аденоассоциированных вирусов, ортопоксвирусов, герперсвирусов и отдельных РНК-вирусов, не относящихся к ретровирусам. Наибольшей емкостью по клонируемой ДНК обладают векторы-ампликоны на основе вируса герпеса простого (до 150 т.п.о), наименьшей (до 4 т.п.о.) – векторы на основе аденоассоциированного вируса.

Достигнутый уровень генной инженерии позволяет перенацеливать векторные системы на разные типы клеток и участки генома человека (векторы на основе ВИЧ). Векторные системы, полученных на основе лентивирусов и аденоассоциированных вирусов, способны интегрировать трансген-экспрессирующую кассету в геном клеток-мишеней. Псевдотипирование векторов с гликопротеинами оболочки вируса бешенства придает им способность ретроградно транспортировать трансгены по нейрональному аксонам в ЦНС. Для изменения тропизма векторных систем исследователями используются: физический таргетинг, заключающийся в покрытии вирусной частицы специальной оболочкой, изменяющей ее природный тропизм и делающей ее неузнаваемой для иммунной системы человека; и генетическая модификация вируса, предполагающая модификацию белков оболочки вектора. Для повышения эффективности транскрипция трансгена в клетке-мишени, разработаны методы транскрипционного таргетинга, предполагающие введение в трансген-экспрессирующую кассету специфических для данных тканей промоторных последовательностей. Отдельные клинические исследования терапевтической эффективности генотерапевтических конструкций на основе ретровирусов закончились гибелью пациентов из-за развившейся Т-клеточной лейкемии.

Список сокращений

AAV – аденоассоциированный вирус.

att – сайт присоединения интегразы в концевых участках провирусной ДНК.

attL, *attR* – левый и правый присоединяющие сайты.

CAEV – вирус артрита и энцефалита коз.

CAR – рецептор коксакивирусов и аденовирусов.

CD46 (белок мембранного кофактора) – повсеместно экспрессирующийся трансмембранный гликопротеин первого типа. Его биологическая функция заключается в предотвращении активации комплемента на аутологичные ткани через связывание и инактивацию компонентов системы комплемента.

CD80/CD86 – гликопротеины первого типа и члены Ig-суперсемейства. Экспрессируются на поверхности антиген-презентирующих клеток, включая дендритные клетки и В-лимфоциты, и действуют как костимуляторные сигналы для активации клеточно-зависимого иммунного ответа.

сHS4 – инсулятор (инсуляторы – особые регуляторные элементы, которые обладают способностью блокировать сигналы, исходящие от окружения) куриного β-глобина.

CMV – немедленный ранний промотор цитомегаловируса.

сPPT – центральный полипуриновый тракт.

СТЕ – конститутивный транспортный элемент.

СТS – центральная терминационная последовательность.

DBD – ДНК-связывающий домен.

DBP – ДНК-связывающий белок.

DIS – димеризационный сигнал.

DIS – димеризационный сигнал.

EGFR – рецептор эпидермального фактора роста.

EIAV – вирус инфекционной анемии лошадей.

FIV – вирус иммунодефицита кошачьих.

GALV – вирус лейкемии гиббонов.

hP – гибридный промотор.

HSPG – гепаринсульфатпротеогликаны, могут служить рецепторами для отдельных вирусов.

HSV 1 – вирус герпеса простого первого типа.

HUVEC – эндотелиальные клетки пупочной вены человека.

IN – интегразы.

JDV (Jembrana disease virus, вирус болезни Джембраны) – лентивирус, вызывающий иммунодефицит у крупного рогатого скота.

JSRV – ретровирус овец Jaagsiekte.

JSRV – ретровирус овец Jaagsiekte; вызывает у овец эпизоотический лёгочный аденоматоз.

LCMV – вирус лимфоцитарного хорименингита.

mEGF – эпидермальный фактор роста мышей.

MHC-I – главный комплекс гистосовместимости I типа, обеспечивает координацию действий различных клеток иммунной системы в подавлении инфекции.

MLV – вирус лейкемии мышей.

MVV – вирус Висна-Маэди.

P – внутренний промотор для экспрессии трансгена.

PBS – сайт связывания праймера.

PCE – посттрансляционный контролируемый элемент.

polyA – гетерологичный polyA-сигнал.

polyA – полиаденилационный сигнал.

polyA (pA) – сигнал полиаденилации.

PPT – полипуриновый тракт.

PRE – посттранскрипционный регуляторный элемент.

RD114 – эндогенный ретровирус кошек, не связанный с болезнью.

RRE – Rev-отвечающий элемент.

RRV – вирус Росс Ривер.

SD – сплайсингдонорный сайт.

SeV – Сендай вирус.

SIN – самоинактивирующийся вектор.

SPA – синтетический polyA-сигнал.

SPG – сиаловые протеогликаны.

TAR – элемент трансактивационного ответа.

U3, R, и U5 установлены по последовательности РНК. Уникальная последовательность U3 расположена вблизи 3'-конца РНК, U5 – вблизи 5'-конца РНК. R представляет собой повтор 5' и 3' концов РНК. Сайт инициации транскрипции находится на стыке U3 и R в 5' LTR, сайт полиаденилирования находится на стыке R и U5 в 3' LTR.

VCAM-1 (васкулярная молекула клеточной адгезии 1) – белок, входящий в суперсемейство иммуноглобулинов, участвует в адгезии лейкоцитов и эндотелиальных клеток, и в передаче сигналов.

VSV-G – гликопротеин вируса везикулярного стоматита.

WPPE – посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка.

ΔU3 – SIN-делеция в U3-регионе 3'-LTR.

ψ – пакующий сигнал.

Литература:

1. *Прасолов В. С., Иванов Д. С.* Ретровирусные векторы в генной терапии // *Вопр. мед. хим.* – 2000. – № 3 (доступно по адресу — <http://medi.ru/pbmc/8800302.htm>).
2. *Bienkowska-Szewczyk K., Szewczyk B.* Expression of genes coding for viral glycoproteins in heterologous systems // *Acta Biochimica Polonica.* – 1999. – Vol. 46, № 2. – P. 325 – 339.
3. *Voeckle S., Wagner E.* Optimizing targeted gene delivery: chemical modification of viral vectors and synthesis of artificial virus vector systems // *AAPS J.* – 2006. – Vol. 8, № 4. – P. 731–742.
4. *Cronin J., Zhang X. Y., Reiser J.* Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping // *Curr. Gene Ther.* – 2005. – Vol. 5. – P. 387 – 398.
5. *Daya S., Berns K. I.* Gene therapy using adeno-associated virus vectors // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2008. – Vol. 21, № 4. – P. 583–593.
6. *Federici T., Kutner R., Zhang X.Y. et al.* Comparative analysis of HIV-1-based lentiviral vectors bearing lyssavirus glycoproteins for neuronal gene transfer // *Genet. Vaccin. Ther.* – 2009. – Vol. 7, № 1 (доступно по адресу — <http://www.gvt-journal.com/content/7/1/1>).
7. *Frecha C., Szecsi J., Cosset F. L. et al.* Strategies for targeting lentiviral vectors // *Curr. Gene Ther.* – 2008. – Vol. 8. – P. 449 – 460.
8. *Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle C., Schmidt M. et al.* LMO2-associated clonal T-cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID^{X1} [see comment] // *Science.* – 2003. – Vol. 302. – P. 415 – 419.
9. *Inder M. V., Nikunj S.* Gene therapy promises, problems and prospects // *Nature.* – 1997. – Vol. 389. – P. 239–242.
10. *Miller D. G., Trobridge G. D., Petek L. M.* Large-scale analysis of adenovirus vector integration sites in normal human cells // *J. Virol.* – 2005. – Vol. 79. – № 17. – P. 11434 – 11442.
11. *Nakai H., Storm T. A., Kay M. A.* Recruitment of single-stranded recombinant adeno-associated virus vector genomes and intermolecular recombination are responsible for stable transduction of liver in vivo // *J. Virol.* – 2000. – Vol. 74. – P. 9451 – 9463.
12. *Nemunaitis J., Edelman J.* Selectively replicating viral vectors // *Cancer Gene Therapy.* – 2002. – Vol. 9. – P. 987–1000.
13. *Nemunaitis J., Edelman J.* Selectively replicating viral vectors // *Cancer Gene Therapy.* – 2002. – Vol. 9. – P. 987–1000.
14. *Nienhuis A. W.* Development of gene therapy for blood disorders // *Blood.* – 2008 – Vol. 111. – P. 4431 – 4444.
15. *Palese P.* RNA virus vectors: where are we and where do we need to go? // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – Vol. 95, № 22. – P. 12750–12752.
16. *Pichla-Gollon S. L., Lin S. W., Hensley S. E. et al.* Effect of preexisting immunity on an adenovirus vaccine vector: in vitro neutralization assays fail to predict inhibition by antiviral antibody in vivo // *J. Virol.* – 2009. – Vol. 83. – P. 5567–5573.
17. *Pluta K., Kacprzak M. M.* Use of HIV as a gene transfer vector // *Act. Biochim. Pol.* – 2009 – Vol. 56, № 4. – P. 531 – 595.
18. *René D., Smith J. A.* Integration site selection by retroviral vectors: molecular mechanism and clinical consequences // *Hum. Gen. Ther.* – 2008. – Vol. 19. – P. 557–568.
19. *Roberts D. M., Nanda A., Havenga M.J. et al.* Hexon-chimaeric adenovirus serotype 5 vectors circumvent pre-existing anti-vector immunity // *Nature.* – 2004. – Vol. 431. – P. 239–243.
20. *Russell D. W., Hirata R. K.* Human gene targeting by viral vectors // *Nat. Genet.* – 1998. – Vol. 18. – P. 325 – 330.
21. *Russell W. C.* Adenoviruses: update on structure and function // *J. Gen. Virol.* – 2009. – Vol. 90. – P. 1 – 20.
22. *Sakurai F.* Development and evaluation of a novel gene delivery vehicle composed of adenovirus serotype 35 // *Biol. Pharm. Bull.* – 2008. – Vol. 31, № 10. – P. 1819 – 1825.
23. *Segerman A., Arnberg, N., Erikson A. et al.* There are two different species B adenovirus receptors: sBAR, common to species B1 and B2 adenoviruses, and sB2AR, exclusively used by species B2 adenoviruses // *J. Virol.* – 2003. – Vol. 77. – P. 1157 – 1162.
24. *Sena-Esteves M., Saeki Y., Fraefel C. et al.* HSV-1 amplicon vectors – simplicity and versatility // *Mol. Ther.* – 2000. – Vol. 2, № 1. – P. 9 – 15.
25. *Seow Y., Wood M. J.* Biological gene delivery vehicles: beyond viral vectors // *Molecular Therapy.* – 2009. – Vol. 17, № 5. – P. 767 – 777.
26. *Sharma A., Lia X., Bangari D. S. et al.* Adenovirus receptors and their implications in gene delivery // *Virus Res.* – 2009. – Vol. 143, № 2. – P. 184 – 194.
27. *Verhoeyen E., Cosset F. L.* Surface-engineering of lentiviral vectors // *J. Gene Med.* – 2004. – Vol. 6 (Suppl 1). – P. 83 – 94.
28. *Wanisch K., Ynez-Muoz R. J.* Integration-deficient lentiviral vectors: a slow coming of age // *Molecular Therapy (www.moleculartherapy.org).* – 2009. – Vol. 17, № 8. – P. 1316 – 1332.
29. *Zaiss A. K., Machado H., Herschman H. R.* The^{q1} influence of innate and pre-existing immunity on adenovirus therapy // *J. Cell. Biochem.* – 2009. – Vol. 108, № 4 (778. doi:10.1002/jcb.22328).
30. *Zeh H. J., Bartlett D. L.* Development of a replication-selective, oncolytic poxvirus for the treatment of human cancers // *Cancer Gene Therapy.* – 2002. – Vol. 9. – P. 1001 – 1012.
31. *Zhang X. Y., La Russa V. F., Reiser J.* Transduction of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells by using lentivirus vectors pseudotyped with modified RD114 envelope glycoproteins // *J. Virol.* – 2004. – Vol. 78. – P. 1219 – 1229.

Использование дрожжевого рекомбинантного интерлейкина-2 (Ронколейкин) в экстренной профилактике послеоперационных инфекционных осложнений у пациентов с сахарным диабетом 2 типа

Зубрицкий В. Ф., Брюсов П. Г., Фоминых Е. М., Низовой А. В., Кулезнёв Р. А., Исламов Р. Н., Самойлов О. А.
Государственный институт усовершенствования врачей МО РФ,
Кафедра военно-полевой хирургии, 29 городская клиническая больница им. Н.Э. Баумана «Утоли мои печали», Москва

Using the Yeast Recombinant Interleukin-2 (Roncoleukin) in Emergency Prophylaxis of Postoperative Infectious Complications in Patients with Type 2 Diabetes

Zubritsky V. F., Brusov P. G., Fominykh E. M., Nizovoi A. V., Kyleznev R. A., Islamov R. N., Samoylov O. A.
The State Institute of Improvement of Doctors, MD RF
Department of Field Surgery; 107392, Moscow, Malaya Cherkizovskaya street, 7. Bauman City Clinical Hospital
No. 29 «Ytoli moi pechali», Moscow

Статья посвящена одной из наиболее актуальных проблем хирургии – профилактике инфекций в послеоперационном периоде. Наиболее эффективным методом такой профилактики является использование антибиотиков, однако в настоящее время, из-за развития антибиотикорезистентности микроорганизмов надёжность этого метода продолжает снижаться. Проведённые авторами исследования позволили выявить причины и разработать рекомендации по улучшению результатов периоперационной антибиотикопрофилактики хирургической инфекции. Было установлено, для профилактики гнойносептических осложнений послеоперационного периода пациентам с сахарным диабетом 2 типа, следует рекомендовать проведение иммунокоррекции препаратом на основе рекомбинантного интерлейкина-2 (Ронколейкин). Схема применения препарата: за 30 мин до операции пациенту вводится подкожно 0,5 мг (500 тыс. МЕ) Ронколейкина, и в этой же дозировке Ронколейкин вводился подкожно на 3 и 5 сутки послеоперационного периода. Реализация такого изменения протокола лечения на практике уменьшило количество случаев инфекционных осложнений после оперативного вмешательства.

Ключевые слова: операция, инфекция, сахарный диабет, интерлейкин-2, Ронколейкин, антибиотикорезистентность.

Библиографическое описание: Зубрицкий В.Ф., Брюсов П.Г., Фоминых Е.М., с соавт. Использование дрожжевого рекомбинантного интерлейкина-2 (Ронколейкин) в экстренной профилактике послеоперационных инфекционных осложнений у пациентов с сахарным диабетом 2 типа // Биопрепараты. – 2011. – № 3. – С. 27–31.

This article is devoted one of the most pressing problems of surgery – infection control in the postoperative period. The most effective method of prophylaxis is the use of antibiotics. At present, due to the development of antibiotic resistance in microorganisms reliability of this method continues to decline. Past studies by the authors have identified the causes and develop recommendations to improve the results of perioperative antibiotic prophylaxis of surgical infection. It was found that for the prevention of septic complications of the postoperative period in patients with diabetes type 2 should be encouraged in addition to traditional antimicrobial agent holding immunocorrection based on recombinant human interleukin-2 (Ronkoleukin). Scheme of application: 30 minutes prior to surgery the patient is administered subcutaneously 0,5 mg (500000 IU) Roncoleukin, and in the same dosage Ronkoleukin was administered subcutaneously at 3 and 5 day postoperative period. The implementation of this change the treatment protocol, in practice, significantly reduced the incidence of infectious complications after surgery and normalized indices of cellular immunity.

Keywords: surgery, infection, diabetes, interleukin-2, Roncoleukin, antibiotic resistance, septic complications.

Bibliographic description: Zubritsky V.F., Brusov P.G., Fominykh E.M. et al. Using the Yeast Recombinant Human Interleukin-2 (Roncoleukin) in Emergency Prophylaxis of Postoperative Infectious Complications in Patients with Type 2 Diabetes // *Biopreparats (Biopharmaceuticals)*. – 2011. – № 3. – P. 27–31.

Для корреспонденции:

Фоминых Е.М. – старший преподаватель кафедры военно-полевой хирургии ГИУВ МО РФ

Адрес: Кафедра военно-полевой хирургии ГИУВ МО РФ

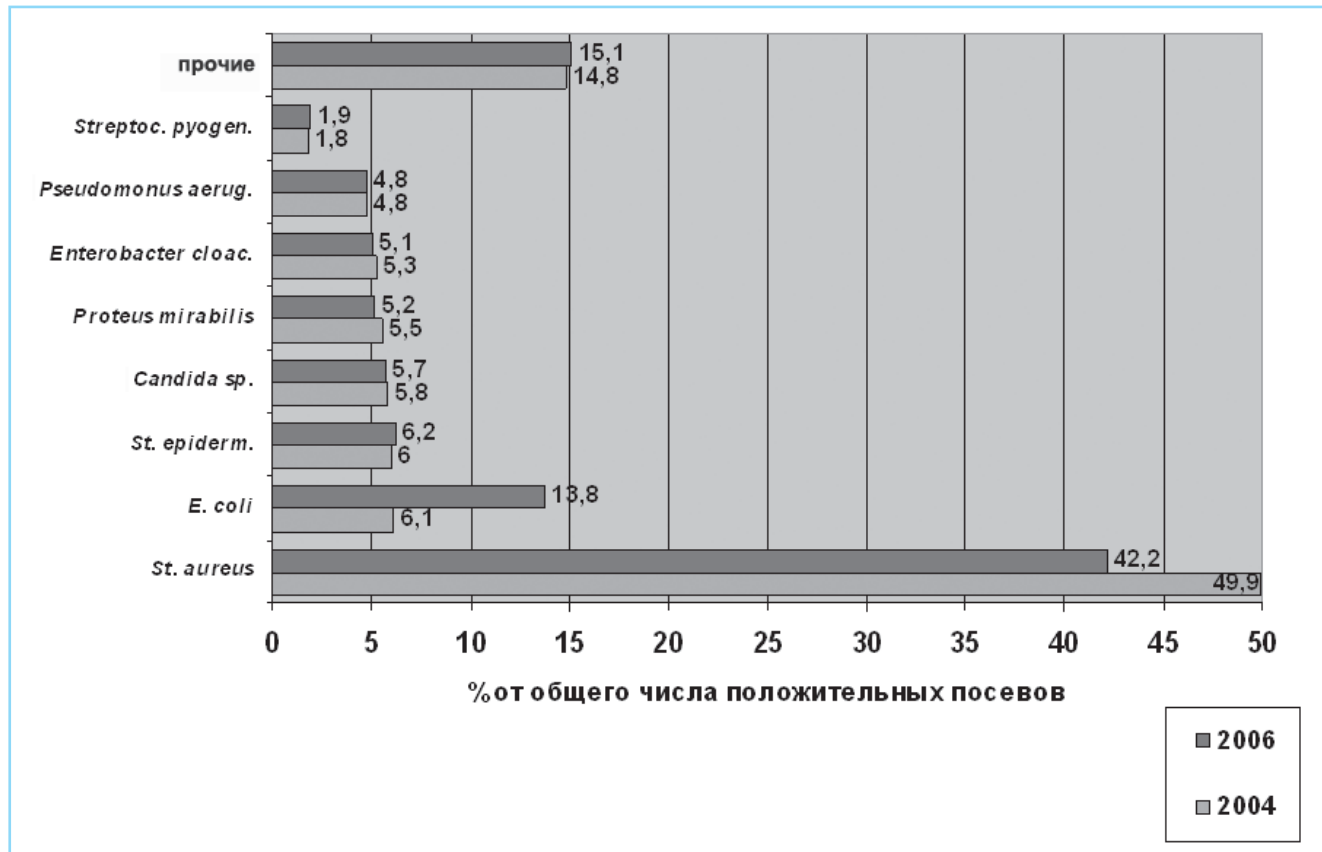
107392, Москва, ул. Малая Черкизовская, д. 7, fominih3@mail.ru

Статья поступила 21.04.2011 г., принята к печати 26.05.11 г.

Проблема профилактики хирургической инфекции актуальна и в настоящее время, поскольку наиболее часто после операции развиваются инфекционные осложнения. В настоящее время частота случаев инфекций операционных ран колеблется от 3 до 65% и не имеет тенденции к уменьшению [1, 2, 5, 7–9, 13, 18, 19, 28].

Распространённость инфекционных осложнений обусловлена рядом биологических и социальных причин. Одной из наиболее важных причин является увеличение числа больных с иммунологической недостаточностью, существенную долю которых составляют пациенты с сахарным диабетом [2–4, 12, 16, 18, 19–21, 23–25, 27]. Необходимость борьбы с инфекционными осложнениями послеоперационного периода имеет и экономический аспект. Инфекции области хирургичес-

кого вмешательства приводят к существенным материальным затратам, увеличивая стоимость лечения более чем на 54% [26]. По этой причине затраты на лечение больного с нозокомиальной инфекцией послеоперационного периода несравнимо выше, чем затраты на любые профилактические меры. Данная проблема особенно актуальна у больных с сахарным диабетом, как из-за распространённости этой патологии, так и из-за необходимости часто выполнять этим больным неотложные оперативные вмешательства, в том числе ампутации [13, 15, 23, 25, 28]. Увеличению количества гнойных осложнений в хирургии способствует повышенная чувствительность больных сахарным диабетом к инфекции. Сочетание сахарного диабета и хирургической инфекции образует порочный круг, при котором инфекция отрицательно влияет на обменные процессы,



Возбудители, выделенные из отделяемого послеоперационных ран конечностей у больных, находившихся в отделении гнойной хирургии.

Таблица 1. Чувствительность к антибиотикам штаммов золотистого стафилококка, выделенных у больных с инфекциями операционного поля

Год	Число посевов, чувствительных к антибиотику (% от общего числа посевов)							
	ванкомицин	рифампицин	амикацин	имипенем	гентамицин	оксациллин	ципрофлоксацин	ампицил./сульб.
2004	67,3	62,0	66,4	41,4	62,3	27,3	18,1	12,0
2004	60,1	56,1	45,1	45,2	25,0	27,1	19,6	12,7

усугубляя инсулиновую недостаточность и усиливая ацидоз. Нарушение обмена веществ и микроциркуляции также ухудшают течение репаративных процессов [13, 15, 23, 25, 28]. Таким образом, пациенты с сахарным диабетом являются группой риска в возникновении инфекционных послеоперационных осложнений.

Методы профилактики хирургической инфекции должны охватывать все звенья возникновения и развития воспалительного очага. Традиционным способом профилактики послеоперационной инфекции является антибиотикопрофилактика. Арсенал средств антимикробной терапии и профилактики хирургических инфекций огромен, однако, возможности антибиотикопрофилактики в настоящее время, ограничены иммунодепрессивным действием этих препаратов на организм больного, а также возможностью развития токсических, аллергических реакций и дисбактериоза. Главным фактором, снижающим эффективность антибиотиков, является быстрое развитие резистентности госпитальных штаммов микроорганизмов к антибиотикам [1–4, 7, 9, 13, 16, 18, 19, 21].

У пациентов с нарушением кровоснабжения дистальных отделов нижних конечностей и сахарным диабетом операции на нижних конечностях нередко приходится выполнять в экстренном порядке.

С целью профилактики хирургической инфекции используют схемы однократного и многократного введения антибиотиков. Традиционная профилактика хирургической инфекции однократным введением цефазолина в дозе 2 г внутримышечно за 1 ч до операции не всегда оказывается эффективной. В целом ряде работ показано, что однократное введение антибиотика с целью профилактики хирургической инфекции не имеет преимуществ перед их многодневным применением [2–4, 7, 9, 16, 18, 19, 21]. Однако введение антибиотиков в течение длительного времени, по сравнению с методикой ультракороткой схемы, приводит к увеличению числа побочных эффектов антибактериальной терапии (дисбактериоз, токсические проявления). При этом также увеличивается риск образования антибиотикоустойчивых штаммов, что не приводит к значительному снижению частоты гнойно-септических осложнений. Введения одной дозы препарата имеют и экономические преимущества по сравнению с длительной антибиотикотерапией.

В 29-й городской клинической больнице Москвы более 8 лет назад создана внештатная комиссия, которая осуществляет эпидемиологической и клинической мониторинг всех случаев гнойно-септических осложнений послеоперационного периода. В 2004 г. наиболее частым возбудителем внутрибольничных послеоперационных осложнений при операциях на конечностях был золотистый стафилококк, рост которого *in vitro* подавлялся ванкомицином, карбапенемами и цефазолином (табл. 1 и рисунок). По этой причине для лечения инфекционных осложнений использовали карбапенемы, а для профилактики – цефазолин.

В 2006 г. в качестве возбудителя инфекционного процесса стала чаще (почти в 2 раза) фигурировать кишечная палочка (рисунок). Существенно изменилась и чувствительность штаммов золотистого стафилококка к наиболее часто используемым антибиотикам. Число штаммов золотистого стафилококка, чувствительного к цефазолину, снизилось с 62,3 до 25,0%, а имипенем – с 66,4 до 45,1% (табл. 1).

Оказалось, что увеличение числа антибиотикоустойчивых микроорганизмов может достигать 17% от всех выделенных штаммов в год (в 2005 г. 42,3% всех штаммов золотистого стафилококка были чувствительны к цефазолину, а в 2006 г. – только 25%). Такое динамичное изменение активности антибиотиков требует пересмотра схем медикаментозной профилактики не реже 1 раза в год.

Так как используемый для профилактики хирургической инфекции антибиотик (цефазолин) показал невысокую активность, а замена его на антибиотики «резерва», противоречат принципам антибиотикопрофилактики [2, 3, 7, 16, 18], были рассмотрены другие пути достижения результата.

Для изучения факторов, способствующих развитию гнойно-септических осложнений в послеоперационном периоде, нами были сопоставлены показатели иммунограмм. Исследования выполняли пациентам перед ампутацией нижних конечностей по поводу облитерирующих заболеваний.

Установлено, что в случаях выявления до операции статистически достоверного снижения относительно и абсолютного содержания зрелых Т-лимфоцитов, Т-хелперов, абсолютных значений Т-цитотоксических лимфоцитов, а также угнетения факторов неспецифи-

Таблица 2. Показатели иммунного статуса у больных сахарным диабетом

Показатели иммунограммы	Средние иммунологические показатели		
	Нормальные значения	В день операции у пациентов	
		с развившимися инф. п/о осложнениями	без инф. осложнений п/о периода
Иммуноглобулин А (г/л)	0,8-4,0	3,1±0,6	3,0±0,4
Иммуноглобулин М (г/л)	0,5-2,0	1,68±0,27	1,71±0,31
Иммуноглобулин G (г/л)	5,36-16,50	10,01±1,57	9,98±1,46
Количество лимфоцитов отн. (%)	23-42	16,7±2,57	17,3±2,32
Количество лимфоцитов абс. (×10 ⁹ /л)	2,3-4,5	1,82±0,27	2,0±0,3
Т-лимфоциты общие отн. (%)	58-76	43,22±3,53	53,63±2,87
Т-лимфоциты общие абс. (кл. в мкл)	1100-1700	788,11±48,13*	964,69±43,36
Т-хелперы общие отн. (%)	36-55	28,03±2,23	31,67±2,18
Т-хелперы общие абс. (кл. в мкл)	400-1100	301,19±26,21	359,58±24,09
Т-цитотоксические отн. (%)	17-37	15,84±2,13	16,36±2,03
Т-цитотоксические абс. (кл. в мкл)	300-700	287,25±26,64	303,47±25,35
В-лимфоциты общие отн. (%)	8-19	7,02±1,15	7,50±1,28
В-лимфоциты общие абс. (кл. в мкл)	190-380	164,11±16,47	181,52±17,34
Фагоцитарное число	5-10	4,0±0,6	4,3±0,5
Фагоцитарный показатель (%)	60-95	45,5±4,2	52,8±3,7
Индекс завершенности фагоцитоза	1-2,5	0,79±0,16	0,84±0,17

* $p < 0,05$.

ческого иммунитета и фагоцитарного показателя в послеоперационном периоде наблюдали инфекционные осложнения ран (табл. 2).

При анализе групп фармакологических препаратов, используемых для иммуноориентированной терапии, отметили, что наиболее перспективными для профилактики инфекционных осложнений могут быть препараты цитокинов – аналогов естественных сигнальных молекул иммунокомпетентных клеток, в особенности интерлейкин-2 (ИЛ-2). Выбор был обоснован тем, что основное действие ИЛ-2 направлено на Т-клеточное звено иммунитета, нарушение которого, как было установлено нами, являлось фактором развития осложнений. Важным обстоятельством было то, что иммуномодулирующее действие ИЛ-2 развивается уже в течение первых суток после введения, возможность получения быстрого эффекта позволяло проводить иммунопрофилактику при неотложных оперативных вмешательствах [6, 10–12, 14, 15, 17, 22–24, 27].

Наше внимание привлёк отечественный препарат рекомбинантного ИЛ-2 – Ронколейкин [11–14, 22, 23].

30 пациентам с сахарным диабетом 2 типа, которым выполнялись ампутации по поводу гангрены нижних конечностей, с целью профилактики хирургической инфекции, в дополнение к традиционной схеме профилактики хирургической инфекции, за 30 мин до операции вводили подкожно Ронколейкин в дозе 0,5 мг (500000 МЕ). В этой же дозировке Ронколейкин вво-

дился 1 раз в день на 3 и 5 сут послеоперационного периода. Для сравнения были взяты результаты лечения 30 пациентов рандомизированных по полу, возрасту, сопутствующей патологии и тяжести состояния. Этим пациентам профилактика инфекции при ампутации на уровне бедра проводилась традиционно. Из рассмотрения исключались больные, имевшие высокий риск несостоятельности раны культи (синдром Лериша, крайние степени сопутствующих заболеваний сердца, почек и т.п.).

У 6 больных (20%) из группы, не получавших терапию Ронколейкином, развились следующие инфекционные осложнения: у 3 пациентов (10%) – нагноение послеоперационных ран, 2 пациентов (6,7%) – пневмония, 1 пациента (3,3%) – восходящая инфекция мочевыводящих путей. Это потребовало курсового применения антибиотиков в послеоперационном периоде. В группе больных, получавших иммунотропную профилактику, только один пациент (3,3%) в дальнейшем нуждался в курсовом лечении антибиотиками из-за нагноения послеоперационной раны.

При анализе лабораторных показателей в группе больных, которым применялась экстренная иммунопрофилактика Ронколейкином, увеличилось количество популяции Т-клеточного звена иммунитета. Статистически достоверным ($p < 0,05$) было увеличение лимфоцитов в основной группе ($25,2 \pm 2,5\%$) по сравнению с контрольной ($18,1 \pm 2,4\%$). В результате

применения Ронколейкина статистически достоверно ($p < 0,05$), к седьмым суткам послеоперационного периода, отмечены более высокие значения показателей содержания зрелых Т-лимфоцитов (абсолютного ($1256,62 \pm 45,63$ в мкл) и относительного ($59,24 \pm 2,34\%$)) и Т-хелперов (абсолютные значения – $537,6 \pm 26,8$ в мкл, относительные – $37,64 \pm 2,02\%$) в основной группе по сравнению с контрольной. Значения в контрольной группе – зрелые Т-лимфоциты (абсолютные значения – $1057,3 \pm 6,7$ в мкл, относительные – $50,5 \pm 3,1\%$) и Т-хелперов (абсолютные значения – $443,63 \pm 26,24$ в мкл, относительные – $31,8 \pm 2,1\%$).

Выводы:

1. Применение Ронколейкина в экстренной послеоперационной иммунопрофилактике у больных сахар-

ным диабетом при ампутации нижних конечностей на уровне бедра достоверно уменьшает число случаев хирургической инфекции и нормализует показатели клеточного иммунитета.

2. Для профилактики гнойно-септических осложнений послеоперационного периода пациентам с сахарным диабетом 2 типа следует рекомендовать введение препарата Ронколейкин подкожно за 30 мин до операции, а также на 3 и 5 сут в дозе 500000 МЕ совместно с традиционными антибактериальными средствами и методами профилактики.

3. Иммунопрофилактика Ронколейкином послеоперационных осложнений у пациентов с сахарным диабетом 2 типа показана при наличии лимфопении или устойчивом Т-клеточном субпопуляционном дисбалансе.

Литература:

1. Антибактериальная терапия абдоминальной хирургической инфекции / Под ред. В.С. Савельева, Б.Р. Гельфанда. – М.: «Т-Визит», 2003. – 250 с.
2. Антибактериальная терапия и профилактика хирургической инфекции: Справочно-информационное руководство для врачей / Под ред. Ю.М. Гаина, С.А. Алексеева, В.А. Стельмаха. – М., 2002. – 894 с.
3. Антибиотикопрофилактика и антибиотикотерапия основных форм хирургических инфекций: Методические рекомендации / ГВМУ МО РФ, РАСХИ. Утверждено начальником ГВМУ МО РФ. – М., 2004. – 26 с.
4. Белоусов Ю.Б., Шатунов С.М. Антибактериальная химиотерапия. Справочное руководство для врачей. – М.: Ремедиум, 2001 н. – 473 с.
5. Военно-полевая хирургия / Под ред. П.Г. Брюсова, Э.А. Нечаева. – М.: «ГЭОТАР-медиа», 1996 – 414 с.
6. Володин Н.Н., Дегтярева М.В., Дмитрюк С.В. и др. Справочник по иммунотерапии для практического врача. М.: «Диалог», 2002. С. 72–86.
7. Гуляев А.Е., Лохвицкий С.В., Ширинский В.Г. Антимикробная профилактика в хирургии. – М.: Триада-Х, 2003. – 125 с.
8. Егорова В.Н., Попович А.М. Ронколейкин. Комплексное лечение инфекционных заболеваний. – СПб: Альтернативная полиграфия, 2004. – 48 с.
9. Ефименко Н.А., Гучев И.А., Сидоренко С.В. Инфекции в хирургии. Фармакотерапия и профилактика. – Смоленск, 2004. – 78 с.
10. Земсков А.М., Земсков В.М., Караулов А.В. Клиническая иммунология: Учебник / Под ред. А.М. Земскова. М.: «ГЭОТАР-медиа», 2008. 432 с.
11. Козлов В.К. Ронколейкин: биологическая активность, иммунокорректирующая эффективность и клиническое применение. – СПб: С.-Петербург. ун-т, 2002. – 82 с.
12. Козлов В.К., Лебедев В.Ф., Толстой А.Д. Патогенетическая иммуноориентированная терапия при тяжёлой хирургической патологии. // Цитокины и воспал. – 2002. Т. 1. № 2. С. – 45.
13. Костюченко А.Л., Бельских А.Н., Тулупов А.Н. Интенсивная терапия послеоперационной раневой инфекции и сепсиса. – СПб: Фолиант, 2000. – 446 с.
14. Лебедев В.Ф., Гаврилин С.В., Козлов В.К. Иммунопрофилактика и опережающая терапия посттравматического сепсиса дрожжевым рекомбинантным интерлейкином-2 // Цитокины и воспал. – 2002. – Т. 1. № 2. С. – 46.
15. Новиков Д.К., Новикова В.И., Сергеев Ю.В., Новиков П.Д. Вторичные иммунодефицитные болезни // Иммунопатол., аллергол., инфектол. – 2003. – № 2. – С. 8–27.
16. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / Под ред. Л.С. Страчунского, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова. – Смоленск: МАКМАХ, 2007. – 464 с.
17. Применение иммуномодуляторов в хирургической практике / Под ред. Ступина В.А., Гридчик И.Е., А.Л. Коваленко. – М.: «ГЭОТАР-медиа», 2005. – 55 с.
18. Плечев В.В., Мурысева Е.Н., Тимербулатов В.М., Лазарева Д.Н. Профилактика гнойно-септических осложнений в хирургии. – М., Изд-во "Триада-Х", 2003 г. – 320 с.
19. Профилактика гнойно-септических осложнений в стационарах хирургического профиля: Методическое пособие / Под ред. И.И. Филатова и А.С. Ермолаева. М., 1995. 38 с.
20. Раны и раневая инфекция: Руководство для врачей / Под ред. М.И. Кузина, Б.М. Костюченко. – М.: Медицина, 1990. 643 с.
21. Рациональная антимикробная фармакотерапия: Руководство для практикующих врачей / Под ред. В.П. Яковлева, С.В. Яковлева. – М. 2003. – 1008 с.
22. Симбирцев А.С. Цитокины: классификация и биологические функции // Цитокины и воспал. – 2004. Т. 3. № 2. С. 16–22.
23. Скороходкина О.В., Славин Л.Е., Крепкогорский Н.В. Коррекция вторичной иммунной недостаточности рекомбинантным ИЛ-2 «Ронколейкин» у больных сахарным диабетом с гнойно-некротическими осложнениями синдрома диабетической стопы. – СПб: «Новая альтернативная типография», 2007. – 40 с.
24. Черешнев В.А., Гусев Е.Ю. Иммунология воспаления. Роль цитокинов // Мед. иммунол. – 2001. – Т. 3. № 3. – С. 361–368.
25. Bharat D., Trivedi V. Prof. diabetes and infection. Endocrinologist, Diabetonologist. Smt. N.H.L. Head department of Endocrinology. Mun. Medical College, Ahmedabad-6, 2004. P. 72–89.
26. Burke J. // Engl. J. Med. – 2003. – V. 348. – P. 651–656.
27. Lorente L., De La Fuente H., Richaud-Patin Y., et al. Innate immune response mechanisms in non-insulin dependent diabetes mellitus patients assessed by flow cytometry // Immunol. – Lett. 2000. – V. 74 (3). P. 239–244.
28. Mangram A.J., Horan T.C., Pearson M.L., et al. Guideline for prevention of surgical site infection, 1999. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. Infect Control Hosp. Epidemiol. – 1999. – V. 20. P. 247–280.

Методы оценки эффективности биоцидной обработки материалов

¹Обухов Ю.И., ²Разуваев А.В.

¹ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», Минздравсоцразвития России, Москва

²ЗАО «КорХимКолор», Москва

Methods of Evaluating Biocide Treatment of Materials Efficacy

¹Obukhov Y.I., ²Razuvaev A.V.

¹Federal State Budgetary Institution «Scientific Center for Expertise of Medical Application Products», Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation

²CJSC «CorChemColour», Moscow

В статье описаны методы качественной и количественной оценки биоцидной обработки материалов. Сделан акцент на применение разных методов оценки с учетом используемых для обработки antimicrobных препаратов (мигрирующие, немигрирующие). Даны критерии оценки результатов исследований. Отмечено, что при использовании мигрирующих препаратов приемлемы классические качественные диффузионные методы исследования и количественные методы с разведением. В случае использования немигрирующих препаратов применяются счетные методы с обязательным шюттированием.

Ключевые слова: биоцидная обработка, методы оценки эффективности обработки, мигрирующие и немигрирующие биоцидные препараты.

Библиографическое описание: Обухов Ю.И., Разуваев А.В. Методы оценки эффективности биоцидной обработки материалов // Биопрепараты. – 2011. – № 3. – С. 32–35.

The following article describes the methods of quantitative and qualitative assessment of biocide treatment of materials. The emphasis was laid on using different methods of assessment, taking into consideration antimicrobial preparations, used for treatment (migrating and non-migrating). Assessment criteria are also represented in the article. It is mentioned that when using migrating preparations, classic quantitative diffusion methods of analysis and quantitative methods with dilution. In case of using non-migrating preparations counting methods with obligatory shaking are applied.

Key words: biocidal handling, efficacy evaluation methods, migrating and non-migrating biocides, methods of biocide treatment evaluation.

Bibliographic description: Obukhov Y.I., Razuvaev A.V. Methods of evaluating biocide treatment of materials efficacy / Biopreparats (Biopharmaceuticals). – 2011. – № 3 – P. 32–35.

Для корреспонденции:

Обухов Ю.И. – начальник управления экспертизы противобактериальных МИБП ЦЭК МИБП ФГБУ «НЦЭСМП»
Адрес: ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», Минздравсоцразвития России
119002, Москва, пер. Сивцев Вражек, 41, microbiolog58@mail.ru
Статья поступила 10.08.2011 г., принята к печати 25.08.2011 г.

Проблема пиодермий (гнойничковых заболеваний кожи) актуальна и в XXI в. Заболевания кожи, обычно, вялотекущие и кроме физических страданий причиняют больному моральные, так как в отличие от других заболеваний, они имеют внешние проявления, заметные для окружающих.

К пиодермиям относятся заболевания кожи различной этиологии. Первопричиной их чаще всего являются стафило- и стрептококки, значительно реже другие микроорганизмы (протей, синегнойная или кишечная палочка и др.).

Среди факторов, способствующих возникновению патологического процесса, выделяют экзогенные (микротравматизм, потертости, повреждение эпидермиса растворами кислот и щелочей, запыленность

воздуха, высокая или низкая температура окружающей среды) и эндогенные (психоэмоциональные перенапряжения, нарушение обмена углеводов, патология желудочно-кишечного тракта и печени, гипергидроз, себорея, гиповитаминозы, несбалансированное питание, угнетение иммунного статуса). Пиодермии могут быть самостоятельными заболеваниями или осложнениями таких распространенных дерматозов, как, например, чесотка, педикулез или экзема [1].

Несмотря на улучшение качества жизни, гигиенического воспитания, соблюдение правил личной гигиены, заболеваемость ими остается высокой, безвидной тенденцией к снижению, особенно в организованных коллективах. Одним из дополнительных факторов снижения кожной заболеваемости, наряду со специфиче-

ским лечением, является ношение нательного белья, носков, обуви, использование постельного белья с антимикробной обработкой.

Проблема качества антимикробной (биоцидной) обработки материалов, контактирующих с кожей человека, требует выбора методов проверки такой обработки. Цель данной статьи ознакомить читателей с современными методами оценки эффективности биоцидной обработки материалов.

Оценить качество биоцидной обработки может микробиологическая лаборатория, имеющая санитарно-эпидемиологическое заключение на право работы с возбудителями инфекционных заболеваний III – IV групп патогенности и аккредитованная на данный вид деятельности. Исследования с целью сертификации могут проводить лаборатории, специально аккредитованные на проведение сертификационных испытаний.

Перед началом проведения исследований специалисты микробиологи должны выяснить тип препарата, с помощью которого проведена обработка материала (мигрирующий или немигрирующий). От этого зависит выбор метода исследования. Мигрирующие препараты – препараты не закрепленные ковалентными связями с обрабатываемым материалом, свободно перемещающиеся из материала в окружающую среду. Немигрирующие препараты – препараты закрепленные ковалентными связями с обрабатываемым материалом, длительное время способные удерживаться на этом материале.

На практике применяется несколько методов контроля эффективности обработки на каком-либо определенном материале, в зависимости от самого субстрата, типа биоцидного препарата, вида микроорганизмов и конечных требований к изделию по биоцидной защите. В России, как и в других странах, существуют нормы и стандарты качественной и количественной оценки эффективности антимикробной обработки [2, 3].

Тесты на антимикробное и противогрибковое действие делятся на три основные группы:

- диффузионные или качественные (с использованием агара) – только для мигрирующих биоцидных препаратов,
- количественные (с использованием жидких питательных сред и разведений препарата),
- счетные (“count test”) – в основном для ковалентно зафиксированных биоцидных препаратов.

Качественные (диффузионные) тесты, проводимые в слое агара, дают представление о качестве обработки материалов препаратами с антимикробным или противогрибковым эффектом. Исследуется степень подавления роста испытуемых микроорганизмов (бактерий или грибов). Пробы испытуемого материала (кусочки тканей размером 2x2 см) выкладываются на чашки Петри с питательным агаром, контаминированным тест-микроорганизмом (10^8 м.к./мл). Чашки с агаром культивируются в термостате при 37°C в течение 24 – 48 ч. Контролем служат образцы тканей, не содер-

жащие антимикробных компонентов. Оценка качества антимикробной обработки испытуемого материала проводится по степени подавления роста бактерий или грибов на питательном агаре, измеряемой от края образца до границы роста микроорганизма, выраженная в миллиметрах. Показатель эффективности оценивается по зоне задержки роста, величина которой должна быть не менее 4 мм. *Зона задержки* роста микроорганизмов вокруг образцов зависит от степени диффузии антимикробных препаратов в слой питательного агара. Поэтому данная методика применима только для мигрирующих препаратов, не закрепленных на волокне ковалентными связями [3].

Количественный метод оценки эффективности обработки материалов мигрирующими препаратами основан на исследовании их действия (в той или иной степени разведения) на штаммы контрольных микроорганизмов. С этой целью готовится ряд разведений испытуемого препарата, а затем в каждую пробирку (флакон) с разведением вносят по 2 зараженных тест-объекта на каждую экспозицию. Экспозиция может составлять от 5 мин до 1 ч (в зависимости от препарата и его концентрации). По истечении времени экспозиции стерильным пинцетом извлекают по 2 тест-объекта и опускают в раствор нейтрализатора или стерильной водопроводной воды. В качестве нейтрализатора используют: для окислителей (хлор, йод, перекись, озон) – 0,5 – 1,0% растворы тиосульфата натрия; для альдегидсодержащих и фенолсодержащих средств – воду; для поверхностно-активных веществ – 0,1 – 1,0% растворы сульфанола; для композиционных средств – универсальный нейтрализатор, содержащий твин-80 – 3%, гистидин – 0,1%, сапонин – 3% и цистеин – 0,1%.

Через 5 мин тест-объекты переносят во вторую пробирку (флакон) со стерильной водопроводной водой. Затем через 5 мин каждый тест-объект помещают в пробирку с жидкой питательной средой (мясопептонный бульон, питательный бульон, сахарный бульон). Контролем служат 2 тест-объекта, не подвергавшихся действию дезинфектанта. Посевы термостатируют при температуре 37°C в течение 24 ч. Результаты учитывают по отсутствию роста микроорганизмов в пробирках с жидкой питательной средой. Концентрацию препарата, оказывающего биоцидное действие, определяют по последней пробирке (флакону) в которой отсутствует рост микроорганизмов [2, 3]. Классические диффузионные методы неприемлемы для оценки эффективности немигрирующих препаратов.

Счетные тесты дают возможность оценить эффективность антимикробной обработки материалов немигрирующими препаратами. Эти тесты служат для определения задержки роста микроорганизмов на конкретном материале. Количество микроорганизмов подсчитывают после 6 – 24 ч культивирования, и сравнивают с числом микроорганизмов в начале теста. Для подсчета числа колоний микроорганизмов создают ряды разведений. Учитывая, что этот тест довольно трудоемкий он применяется лишь в тех случаях, когда неприменим качественный тест. Контроль качества

биоцидной обработки с использованием счетных тестов в микробиологических лабораториях осуществляется с применением следующих международных стандартов:

- антимикробного действия (стандарты SN 195920, AATCC 147, JIS L 1902, ASTM E 21-49) [4];
- противогрибковой эффективности стандарты SAN BIO 12/94, AATCC 30, ASTM G 21-96, EN ISO 11721-1) [5];
- активности против водорослей (стандарт SAN BIO 33/99) [6];
- степени защиты от пылевого клеща (стандарты HPLC, NF G 39-011) [7];
- проверка противогнилостной активности («Похоронный тест» EN ISO 11721-1) [8].

Счетный метод (count test) контроля антимикробного действия (японский JIS L 1902, метод со встряхиванием DuPont ASTM E 21-49) заключается в следующем:

Измельченные образцы тест-объекта (материал с обработкой немигрирующим препаратом) и контрольного тест-объекта (необработанный материал) весом 2 г помещаются в пробирки с питательным бульоном, содержащим определенное количество микроорганизмов *Staphylococcus aureus* (золотистый стафилококк) и *Escherichia coli* (кишечная палочка) в виде суспензий с различной исходной концентрацией: 10^9 , 10^7 , 10^5 . Испытания проводятся при непрерывном встряхивании (с использованием шюттеля или шейкера) герметично закрытой пробирки при комнатной температуре в течение 24 ч. Это позволяет разорвать ковалентные связи препарата с материалом. Через 24 ч отбирают по 1 мл взвеси и проводят серийные разведения в 100, 1000, 10 тыс. и 100 тыс. раз до тех пор, пока количество колоний будет доступно для подсчета. Затем осуществляют посеvy на твердые питательные среды и термостатируют при температуре 37° С в течение 48 ч.

Через 48 ч производят подсчет колоний в КОЕ/мл (КОЕ – колониеобразующая единица). Полученное значение умножается на степень разведения и сравнивается с исходным количеством микроорганизмов. Снижение микробного обсеменения питательного бульона оценивается в процентах по отношению к исходной микробной нагрузке в суспензии и сравнивается с аналогичным показателем контрольного тест-объекта.

Оценка результатов тестирования проводится в баллах по следующей шкале:

0,0 – 0,1% – значительный рост, отсутствие антимикробного эффекта.

0,1 – 90% – незначительное снижение количества колоний микроорганизмов, недостаточное антимикробное действие.

90 – 95% – значительное снижение количества колоний микроорганизмов, хороший антимикробный эффект.

95 – 99% – значительное снижение количества колоний микроорганизмов, очень хороший антимикробный эффект.

99% и более – сильное снижение количества коло-

ний микроорганизмов, отличный антимикробный эффект [9].

*Диффузионный метод проверки противогрибкового действия (SAN BIO 12/94, швейцарский SN 195 920). Подготовка чашек Петри с раствором агара проводится точно так же, как в диффузионном методе проверки антимикробного действия, но вместо штаммов бактерий вносятся стандартные споры грибов: *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Trichophyton mentagrophytes*. Затем проводится встряхивание и термостатирование. *Candida albicans* остаются в термостате 2 сут, *Trichophyton mentagrophytes*, *Aspergillus niger* и *Cladosporium sphaerospermum* 7 сут при температуре $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$. Оценка проводится аналогично, как в диффузионном методе проверки антимикробного действия.*

Метод проверки противогрибкового действия (ASTM G 21-96) отличается от предыдущего метода тем, что не используется питательная среда, а споры грибов распыляются по поверхности материала, находящегося в чашке Петри. В данном случае инкубация проводится 28 сут при температуре $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Метод проверки противогнилостной активности («Похоронный тест» EN ISO 11721-1) проводится с целью испытать сопротивляемость обработанного материала к действию микроорганизмов, содержащихся в почве. Пробы испытуемого материала закапываются в биологически активную землю, содержащую природный спектр микроорганизмов, на 4 нед. и регулярно смачиваются. После чего определяется потеря веса и потеря разрывной нагрузки по сравнению с исходным образцом.

Оценка антимикробной активности проводится в соответствии с [2, 3]. Для количественной оценки антимикробной активности исследуемых материалов так же используется *капельный метод заражения образцов*.

На тест-объект размером 2x2 см наносят пипеткой 0,1 мл суспензии 18-часовой культуры (золотистый стафилококк, кишечная палочка). В указанном объеме суспензии должно содержаться 10^4 м.к. по стандартному образцу мутности (СОС 42-28-85П). После контакта в течение 10, 20, 30, 40, 50, 60 мин тест-объекты отмывают в течение 5 мин в широких пробирках с бусами и 10 мл стерильной водопроводной воды или раствора соответствующего нейтрализатора (для дифференцирования бактерицидного или бактериостатического действия) и засевают в чашку Петри в толщу МПА по 0,5 и 1 мл. Учет результатов проводят через 24 – 48 ч, сравнивают количество выросших микроорганизмов в посевах смывной жидкости с антимикробных и контрольных образцов, высчитывают процент гибели тест-микроорганизмов.

Пример расчета: в посевах смыва с контрольного образца выросло, соответственно внесенному в агар количеству смывной жидкости, 56 и 100 колоний микроорганизмов, среднее количество м.к. в 1 мл – 106, в посевах смыва с образца антимикробной ткани – 4 и 10, среднее – 9.

Количество клеток, выросших в контроле, принима-

ют за 100%, в опыте – за X%. Определяют значение X, т.е. процент выросших колоний с антимикробной ткани:

$$106 - 100\%$$

$$9 - X\%$$

$$X = (9 \times 100) : 106 = 8,49.$$

Высчитывают процент гибели: $100\% - 8,49\% = 91,51\%$.

Снижение числа тест-микроорганизмов при капельном способе заражения антимикробных тканей должно достигать не менее 90 – 95%.

Метод аэрозольного заражения тест-образцов имитирует естественное инфицирование образцов.

Используют 18-часовую бульонную культуру золотистого стафилококка, в которой содержится 1,5 – 2 млрд. жизнеспособных клеток в 1 мл. В качестве генератора аэрозолей применяют распылитель А.А. Смородинцева. На дно аэрозольной камеры (объем 1 м³) помещают тест-объекты испытуемых материалов размером 2×2 см, распыляют 3 мл бульонной культуры. Через 16 – 18 ч после распыления определяют количество выживших микроорганизмов на тест-объекте путем отмыва в стерильной водопроводной воде с последующим высевом на питательные среды и учетом результатов (см. выше).

Снижение числа тест-микроорганизмов при аэрозольном способе заражения антимикробных тканей должно составлять не менее 70%.

Суспензионный метод позволяет определить зависимость антимикробной активности тканей от микробной нагрузки.

В пробирки с 1 мл мясопептонного бульона (рН 7,2 – 7,4), содержащие 10-кратно уменьшающееся количество клеток (10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 м.к./мл) тест-культур (золотистый стафилококк, кишечная палочка) помещают тест-объект исследуемого материала размером 1 см². Учет результатов производят после 24 ч инкубации посевов в термостате при 37° С, констатируя отсутствие роста в пробирках с максимальным

числом внесенных клеток тест-культур.

Определение эффективности антимикробной обработки материалов суспензионным методом осуществляется по росту микроорганизмов в пробирках с образцами опытных материалов, микробная нагрузка которых не ниже 10^5 м.к./мл.

Авторами проведены собственные сравнительные исследования возможности оценки эффективности биоцидной обработки материалов немигрирующими препаратами. В результате отмечено, что определить биоцидный эффект данных материалов возможно только с использованием счетных тестов со встряхиванием.

Выводы:

1. Оценить качество обработки материала биоцидными препаратами может микробиологическая лаборатория, имеющая санитарно-эпидемиологическое заключение на право работы с возбудителями инфекционных заболеваний III – IV групп патогенности и аккредитованная на данный вид деятельности. Исследования с целью сертификации могут проводить лаборатории, специально аккредитованные на проведение сертификационных испытаний.
2. Перед началом проведения исследований специалисты микробиологи должны выяснить тип препарата, с помощью которого проведена обработка материала (мигрирующий или немигрирующий). От этого зависит выбор метода исследования.
3. В случае использования мигрирующих препаратов приемлемы классические качественные диффузионные методы исследования и количественные методы с разведением.
4. В случае использования немигрирующих препаратов применяются счетные методы с обязательным шюттелированием (встряхиванием) в течение 24 ч.

Литература:

1. Шапошников О.К., Павлов С.Т. и др. Кожные и венерические болезни. – М., 1985 г.
2. Методические указания по лабораторной оценке антимикробной активности текстильных материалов, содержащих антимикробные препараты. – М., ВНИИДиС, 1984 г.
3. Методы испытаний дезинфекционных средств, для оценки их безопасности и эффективности. Утверждены Главным государственным санитарным врачом. – М., 1998 г.
4. Стандарты SN 195920, AATCC 147, JIS L 1902, ASTM E 21-49.
5. Стандарты SAN BIO 12/94, AATCC 30, ASTM G 21-96, EN ISO 11721-1.
6. Стандарт SAN BIO 33/99.
7. Стандарты HPLC, NF G 39-011.
8. Тест EN ISO 11721-1.
9. Счетный метод (count test) контроля антимикробного действия (японский JIS L 1902, метод со встряхиванием DuPont ASTM E 21-49).

Ранняя диагностика и лечение заболеваний дифтерией, сопряженных с риском для жизни

¹Корженкова М.П., ²Берко А.И., ²Шестакова О.М., ²Малышев Н.А.

¹ФБУН «НИИЭМ им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора

²ГУЗ Инфекционная клиническая больница № 1 ДЗ города Москвы

Early Detection and Treatment of Diphtheria Cases, Risk to Life Conjugated

¹Korzhenkova M.P., ²Berko A.I., ²Shestakova O.M., ²Malyshev N.A.

¹Federal Budget Institution of Science «Gabrichhevskiy Scientific Research Institute of epidemiology and Microbiology» of the Federal Service on Surveillance for Consumer Rights Protection and Human Well-being

²State health care institution Infectious clinical hospital № 1 of the Department of Healthcare of Moscow

Эпидемия дифтерии в России и Москве в 90-х годах XX века была прекращена благодаря масштабной иммунизации всего населения, включая взрослых. Эпидемия отличалась высоким удельным весом заболеваний, сопряженных с риском для жизни. В лечении этих заболеваний, включая гипертоксическую (100%-ная летальность), в современных условиях появилась возможность применить более адекватную тактику терапии гетерологичной противодифтерийной сывороткой в комплексе с экстракорпоральной детоксикацией и методами симптоматической ургентной терапии. Эффект лечения напрямую зависел от своевременной госпитализации и ранней диагностики заболеваний из группы риска по летальности. Ранняя диагностика и комплексная терапия способствовали уменьшению тяжести токсических осложнений и кратному снижению летальности в этой группе больных.

Ключевые слова: группа риска по летальности, ранняя диагностика, противодифтерийная сыворотка, экстракорпоральная детоксикация.

Библиографическое описание: Корженкова М.П., Берко А.И., Шестакова О.М., Малышев Н.А. Ранняя диагностика и лечение заболеваний дифтерией, сопряженных с риском для жизни // Биопрепараты. – 2011. – № 3 – С. 36–41.

Diphtheria epidemic in Russia in Moscow in the 90's of the XX century was stopped due to widespread immunisation of the population, including adults. This epidemic was notable for the high disease ratio, risk to life conjugated. The therapy of these diseases, including hypertoxic form of diphtheria (100% case mortality), in modern conditions includes and opportunity to apply more suitable tactics of heterologous antidiphtheric serum in combination with extracorporeal detoxication and urgent symptomatic therapy. The efficacy of the therapy in group at high-risk for mortality depended directly on early admission to hospital and early disease detection. Early disease detection and complex therapy helped to reduce toxic sequelae rate and multiple decrease of mortality in this group of patients.

Keywords: group at high-risk for mortality, early detection, antidiphtheric serum, extracorporeal detoxication.

Bibliographic description: Korzhenkova M.P., Berko A.I., Shestakova O.M., Malyshev N.A. Early detection and treatment of diphtheria cases, risk to life conjugated // Biopreparats (Biopharmaceuticals). – 2011. – № 3 – P. 36–41.

Для корреспонденции:

Корженкова М.П. – ведущий научный сотрудник ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора.

Адрес: 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10, тел. 8 (499) 193-04-68, e-mail: ikb_1@mail.ru

Статья поступила 09.08.2011 г., принята к печати 28.08.2011 г.

В эпидемию дифтерии 1990-х гг. XX в. наиболее интенсивные показатели заболеваемости в Москве отмечены в 1993 – 1995 гг.: 26,9 – 46,9 – 26,9 на 100 тыс. населения. Увеличение смертности в пик эпидемии в 1994 г. в Москве в 45 раз (1,67 на 100 тыс. населения), по России в 25 раз (0,75) по сравнению со средними показателями 1980-х гг. произошло в связи со значительным ростом заболеваний группы риска по летальности и более злокачественным их течением. К заболеваниям группы риска относятся гипертоксическая (ГД) и токсическая дифтерия III и II степени тяжести (ТД III, ТД II), токсическая с поступлением в периоде осложнений, дифтерийный круп и тяжелые комбинированные формы. В годы максимального

подъема заболеваемости (71,2% больных), как и за весь период эпиднеблагополучия (1989 – 2004 гг.) дифтерия была сопряжена с риском для жизни у каждого пятого взрослого и каждого десятого ребенка [5]. Для лечения таких больных ранее применявшаяся тактика специфической терапии оказалась неэффективной.

От попытки количественного определения токсина у больных токсической дифтерией мы были вынуждены отказаться в связи с невозможностью количественного определения дифтерийного токсина (ДТ) в крови пациентов [4]. Пришлось эмпирическим путем (как в 50-е гг. XX в.) определить адекватные первоначальные дозы противодифтерийной сыворотки (ПДС) для разных по тяжести форм дифтерии, уменьшить до 8 ч

минимальные интервалы при повторном её введении, а так же определить клинические критерии для уменьшения доз и отмены лечения сывороткой. Курсовые дозы определялись в ходе лечения и были индивидуальными.

Клинико-лабораторные наблюдения в Городском учебно-методическом центре по дифтерии на базе ИКБ № 1, где были разработаны и внедрены критерии ранней клинической диагностики и методы эффективной терапии наиболее тяжелых форм дифтерии, ещё раз подтвердили мнение о том, что ведущим критерием в установлении тяжести болезни и её прогноза, а также в тактике лечения больных является оценка состояния очага дифтерийного воспаления от начала его формирования вплоть до завершения [3, 4]. Преждевременная отмена сыворотки является одной из причин развития тяжелых осложнений, так как продукция токсина в активном очаге еще продолжается. Об этом свидетельствует более быстрое снижение (расхождение) лошадиного антитоксина (АТ) после отмены ПДС у больных с последующим развитием тяжелых осложнений [1].

Следует иметь в виду, что в очаге фибринозно-некротического воспаления в оптимальных условиях для возбудителя дифтерии происходит его бурное размножение и гибель, что сопровождается в наиболее тяжелых случаях выделением летальных доз токсина и манифестной общей и местной симптоматикой. Еще на международном микробиологическом съезде в 1894 г. одновременно с признанием лечебного значения противодифтерийной сыворотки была установлена необходимость ее быстрого применения в начале болезни [2]. Это положение никем не опровергнуто до сих пор и получило свое подтверждение во время последней эпидемии.

Эффект лечения смертельно опасных форм дифтерии зависит от раннего применения адекватных тяжести заболевания доз ПДС. Реальные возможности для применения адекватно высоких доз гетерологичного антитоксина сложились к эпидемии 1990-х гг.: высокая очистка ПДС, эффективные способы профилактики и лечения анафилактических реакций, доступность экстракорпоральной детоксикации. Разработка и внедрение комплексной специфической, экстракорпоральной и инфузионной детоксикации (ИКБ № 1, Москва) позволили в несколько раз снизить летальность при наиболее тяжелых вариантах токсической дифтерии. По данным 1994 – 1995 гг. летальность при II степени составила 1%, при III – 7,5%, гипертоксической 25,6% [3, 4].

Ранняя диагностика токсической и гипертоксической дифтерии это не только клиническое распознавание дифтерии в начальном периоде болезни (от момента появления ее первых симптомов до появления отека подкожной клетчатки шеи), но и определение формы болезни по тяжести. В этом – залог эффективного лечения. В начальном периоде симптомы находятся в развитии, их выраженность прогрессирует, появляются новые симптомы, а часть еще отсутствует. Чем тяжелее форма болезни, тем быстрее развивается тот комплекс симптомов, на котором базируется диагноз.

Диагностика основывается на 3 комплексах симптомов, которые характеризуют интоксикацию, болевую реакцию и воспалительный процесс на слизистых обо-

лочках ротоглотки. Все эти симптомы обусловлены повреждающим действием дифтерийного экзотоксина и соответствуют друг другу по выраженности и темпам развития. Симптомы интоксикации и болевой реакции не специфичны. Вместе с тем они позволяют рано определить степень тяжести болезни. Симптомы местного процесса – специфичны для токсической дифтерии и отражают ее тяжесть. Максимальный учет симптомов с оценкой темпа их прогрессирования по часам от начала болезни дает возможность диагностировать гипертоксическую дифтерию уже через несколько часов от появления первых симптомов, а токсическую III степени – в первые сутки.

Гипертоксическая дифтерия. Наблюдения проведены у 91 больного. Бактериологическое подтверждение – 86,8%, у всех – биовар *gravis* высокой степени токсигенности. Госпитализация в инфекционный стационар в первые сутки болезни – 36,2%, первую половину 2-х суток – 36,3%, вторую половину 2-х суток – 18,7%. Заболевания начинались очень остро с фиксацией часа появления первых симптомов. Продромальный период от нескольких часов до 3 суток (легкое недомогание и слабая боль в горле), реже – появление отечности верхней части шеи без нарушения мочеиспускания, отмечен у 13% больных.

Симптомы интоксикации: быстрое повышение температуры до высоких цифр с ознобом, общая разбитость и ломота (артралгии – у 18% больных), прогрессирующая слабость, анорексия (более чем у половины больных) или снижение аппетита, бледность, головокружение, оглушенность, нарушение сна, тошнота, многократная рвота (у 12% больных), приступообразные боли в животе (у 7% больных), у некоторых больных – страх смерти.

У трети больных отмечалась эйфория или делирий, преимущественно при поступлении в начале 2-х суток болезни. В это время у них наблюдались гиперемия лица и шеи, блеск глаз, яркость губ, а так же – тахикардия и повышение АД. У 4 больных, поступивших в начале вторых суток болезни, еще до начала лечения отмечено резкое снижение высокой температуры до 35,3–36,0°C. Всё это проявления инфекционно-токсического шока (ИТШ).

Болевые симптомы: у всех больных были четко выражены 3 болевых симптома: боль в горле при глотании, при пальпации тонзиллярного лимфоузла, болезненность и затруднение при открывании рта. Четвертый болевой симптом, боль в области шеи, отмечен у 27% больных, поступивших в первые сутки болезни.

Боль в горле интенсивно нарастала. Иногда уже в первые часы прием твердой пищи, а затем и питье становились невозможными. Больные вздрагивали при пальпации тонзиллярного лимфоузла уже в самые ранние сроки госпитализации. У большинства больных болевой тризм был выражен настолько резко, что миндалины были недоступны осмотру. В то же время у некоторых больных при осмотре в конце первых – начале 2-х суток, несмотря на болезненность при открывании рта, осмотр был возможен. Боль в области шеи разной степени интенсивности появлялась рано, уменьшалась и исчезала по мере увеличения отека шеи.

Внезапная полная анестезия болевых ощущений наступила у 3 больных на 2-е – 3-и сутки болезни. Кроме того, еще более чем у половины больных в эти же сроки отмечено заметное уменьшение болевых ощущений, не адекватное выраженности воспалительного процесса в ротоглотке (ИТШ). Дополнительные критерии тяжести – высокая степень лейкоцитоза, нейтрофильного и палочко-ядерного сдвига, ускорения СОЭ.

Местное воспаление: наблюдалось быстрое развитие токсического отека слизистых оболочек ротоглотки, с первых часов болезни, начиная с миндалин, они выдвигались в передние отделы ротоглотки. Увеличение за счет отека было быстрым, а поверхность – выпуклой. Усиление отека приводило к соприкосновению миндалин, их смещению кзади или кпереди и погружению в нижние отделы ротоглотки. Уже к середине первых суток у многих больных осмотр миндалин был затруднен, тем более, что отмечалось усиление болевого тризма. В 1990-е гг. отмечена своеобразная четкая граница отека мягкого и твердого неба, которая чаще всего была ступенчатой. При его продвижении на соседние участки четкая граница сохранялась. Прогрессирование токсического отека слизистых оболочек ротоглотки приводило к фарингеальному стенозу и вынужденному положению больного – сидя или стоя. Среди больных, госпитализированных в первые 36 ч от начала болезни, фарингеальный стеноз отмечен у 95,5%.

Редкие варианты местного процесса – неравномерное развитие отека в ротоглотке либо его отсутствие на протяжении первых суток на фоне прогрессирующей интоксикации и болевых симптомов.

Наряду с яркой гиперемией слизистых оболочек больше чем у половины больных отмечалась их бледность с синюшным или рыжеватым оттенком и инъекцией сосудов. Раннее геморрагическое пропитывание отдельных участков миндалин, а затем и других отделов ротоглотки можно было наблюдать у всех больных. У 3 больных к концу первых суток отмечена сплошная геморрагическая имбиция отечной поверхности. Уже через несколько часов, а тем более в первые сутки болезни у всех больных можно было обнаружить фибриновые налеты на разных этапах их формирования: более зрелые, грубые с геморрагическим пропитыванием на миндалинах и свежесформирующиеся (в виде фибриновых рыхлых переплетений либо желеобразного покрытия) – за их пределами, включая мягкое и даже твердое небо. Редкий вариант – формирование на миндалинах геморрагического струпа.

В течение первых суток тонзиллярные лимфоузлы увеличивались до 2×3,5 и 3,5×5 см, достигая в начале вторых суток размеров 5×7, 6×9 см и более, плотные и резко болезненные. Отек подкожной клетчатки шеи начинал появляться над лимфоузлами уже через несколько часов от начала болезни (с 3 – 5 до 10 – 12 ч). К концу первых суток он достигал ключицы, предварительно появившись на лице, в заушной области или на спине, становился плотным. В это же время становились заметными геморрагические элементы над отеком. У трети больных отмечен подчелюстной лимфаденит с отеком подбородочной области (поражение корня языка и гортаноглотки). В конце первых –

начале вторых суток у части больных выявлялся плотный лепешкообразный отек подкожной клетчатки на отдельных участках грудной клетки, удаленных от нижней границы отека шеи: в центре грудины, на плече, в подмышечной области, над лопаткой и т.д.

Больная 33 лет, не привита, поступила через 16 ч от начала болезни. Заболела очень остро в 17 часов дня – повышение температуры тела с ознобом до 39° С, ломота, слабость, анорексия, боль в горле. Через 3 ч появился отек шеи справа над увеличенным и болезненным лимфоузлом. Ночью не спала – усиление слабости, головокружение, тошнота и позывы на рвоту, невозможность глотать из-за сильной боли, иррадиация боли в ухо, чувство «распирания» в горле, боль в области шеи. При поступлении – тонзиллярный лимфоузел справа 2×3,5 см, плотный, резко болезненный, отек подкожной клетчатки на шее до II шейной складки, а так же – на лице и верхней части спины, 4 компонента болевой реакции. Рот открывался с затруднением. Правая миндалина увеличена до средней линии (III степень), левая – до I степени, отек мягкого неба и язычка. Миндалины сплошь покрыты фибриновой пленкой с участком геморрагического пропитывания. Несмотря на введение 150 тыс. МЕ ПДС и инфузиями к 22 часу от начала болезни лимфоузел увеличился до 3×4 см, стал более болезненным, отек шеи спустился до ключицы, появилось затрудненное дыхание. К 26 часу – лимфоузел увеличился до 3,5×5 см, отек стал плотным и еще увеличился, перестала контурироваться ключица. Введение ПДС в той же дозе проведено еще 2 раза с интервалами в 8 часов. К 35 – 36 часу усилилось затрудненное дыхание (больная приняла положение сидя), тонзиллярный лимфоузел достиг размера 12×15 см, появился плотноватый отек в области грудины, рот почти не открывался, на мягком и частично твердом небе – сплошной выходящий отек с четкой границей, покрытый черно-коричневой блестящей коркой, опускался в нижние отделы ротоглотки, образуя сплошной конгломерат. Разглядеть миндалины и язычок не возможно. Дозы ПДС увеличены до 220 тыс. МЕ через 8 – 12 часов, с 49-го часа болезни начато проведение плазмафереза (ПА). Всего проведено 3 сеанса ПА ежедневно с общей эксфузией плазмы 4750 мл. На курс лечения получила 3640 тыс. МЕ ПДС. Осложнения: миокардит I – II степени, полинейропатия I степени, токсический нефроз. При катанестическом наблюдении осложнений не выявлено.

Больной 48 лет, не привит, поступил через 28 часов от начала болезни (продромальный период – 2 дня). Интоксикация выражена резко. В момент поступления отек подкожной клетчатки был плотным на лице, спине и шее с одной стороны, опускался на уровень ключицы, на коже – геморрагическая сыпь (в анамнезе – появление отека шеи с 5 – 6 часа болезни). Тонзиллярный лимфоузел 5,0×6,0 см, болезненный, плотный. Открывание рта затруднено, выпуклый отек мягкого и твердого неба. Фибриновые налеты на мягком и частично твердом небе – с сильным геморрагическим пропитыванием. Миндалины видны плохо. Дыхание затруднено. На следующий день на фоне лечения наблюдались усиление интоксикации с возбуждением больного по типу делирия и присоединение процесса

на второй половине ротоглотки, лимфоузел увеличился до 6,0×8,0 см, отек спустился на грудную клетку. Больной получил курсовую дозу ПДС 1350 тыс. МЕ, 4 плазмафереза со 2 по 7 день болезни (общая эксфузия плазмы 7,5 л). Осложнения: миокардит II степени, полинейропатия II степени, токсический нефроз.

Токсическая дифтерия III степени тяжести.

Объем наблюдений – 109 больных. Бактериологическое подтверждение – 82,6%, в том числе биовар *gravis* – 75,2%, *mitis* – 7,4%. Сроки поступления: в первые сутки – 1,8%, на 2-е – 41,3%, на 3-и – 33,9%, на 4-е – 20,2%, 5-е и более – 2,7%. По сравнению с гипертонической дифтерией время обращения и госпитализации сдвигалось на сутки.

При сходстве симптомов гипертонической и токсической дифтерии III степени принципиальное отличие между ними заключалось в более медленных темпах их развития и меньшей выраженности у больных токсической дифтерией III степени. У части больных (5%) наблюдался продромальный период. В условиях циркуляции высокотоксигенного возбудителя у больных токсической дифтерией III степени интоксикация была более выражена, чем в прежние годы – у части больных наблюдались головокружение и оглушенность, артралгии, частичная анестезия болевых ощущений (на 3 – 4 день болезни).

Отмечалась большая выраженность токсического отека слизистых оболочек ротоглотки. У части больных (19,3%) даже наблюдалось возникновение фарингеального стеноза, но менее выраженного и в более поздние сроки, чем при гипертонической дифтерии – у 7% больных с конца 2-х, у 12% – на 3–4 сутки. Болевой тризм жевательных мышц на 2-е сутки был выражен у 75,5% больных, при поступлении на 3-и сутки – у 65%. Тонзиллярные лимфоузлы на 2-е сутки достигали 3×4 или 3×5 см (84%), дальнейшее увеличение до 5×6 см отмечено у 18% больных. Отек подкожной клетчатки шеи у большинства больных появлялся над лимфоузлами с конца первых суток, тогда как в 1980-ые гг. – чаще в начале 2-х суток. Дальнейшее увеличение отека шеи: начало 2-х суток – середина шеи, конец 2-х суток – у основания шеи и над ключицей, на 3-и сутки – ниже ключицы. У 30,3% больных отмечался плотный выпуклый отек подкожной клетчатки, у 24% больных его распространение на лицо и спину.

У больной 52 лет, получившей с ее слов 2 прививки против дифтерии с интервалом в 8 лет, заболевание началось остро в 19 часов вечера – слабость, озноб, плохой сон, боль в горле. Температуру измерила утром на следующий день – 39,0° С. Боль в горле слева стала сильнее. Наблюдалось обморочное состояние, слабость усилилась. Вечером заметила отек шеи слева (конец первых суток). Обратилась к врачу утром следующего дня, тогда же была попытка вскрытия паратонзиллярного абсцесса, гноя не получено. Поступила в инфекционную больницу через 48 ч от начала болезни. При осмотре тонзиллярный лимфоузел слева был увеличен до 3,0×4,0 см, отек подкожной клетчатки шеи – ниже середины шеи. Утром на 3-и сутки лимфоузел увеличился до 4,0×6,0 см, отек стал ниже ключицы. В ротоглотке – отек мягкого неба, язычка, миндалин почти смыкаются, фибриновые пленчатые налеты с

переходом на мягкое небо. Местами – незначительное геморрагическое пропитывание налетов. Лечение с начала 3-х суток болезни – ПДС 2000 тыс. МЕ на курс и 3 плазмафереза с общей эксфузией плазмы более 6000 мл. Осложнения: миокардит II степени, полинейропатия II степени, токсический нефроз.

В лечении больных токсической дифтерией в годы эпидемического подъема на фоне циркуляции возбудителя высокой степени токсигенности применялись специфическая, экстракорпоральная и инфузионная детоксикация. Специфическая детоксикация осуществлялась парентеральным введением стандартной лошадиной антидифтерийной противодифтерийной сыворотки. Основная роль этого способа детоксикации – как можно быстрее блокировать очаг фибринозно-некротического воспаления, а затем прекратить его активность. Это достигалось путем создания и поддержания высокой концентрации антидифтерина в крови. Первоначальные дозы и интервалы для повторного введения сыворотки соответствовали клинической форме дифтерии (табл. 1). Стало необоснованным указывать курсовые дозы. Повторное введение сыворотки проводили, исходя из оценки обратной динамики очага воспаления.

Например, больной с диагнозом ГД стал получать лечение с начала вторых суток болезни (рис. 1а, 1б). В связи с невозможностью провести плазмаферез (ПА) назначены максимальная доза ПДС 250 тыс. МЕ с интервалом 8 ч и значительный объем инфузионной детоксикации. Уже через 24 ч отмечена положительная динамика, свидетельствующая о снижении активности очага воспаления. Это позволило уменьшить дозу и увеличить интервал для повторного введения ПДС на 2-е и 3-и сутки лечения: по 150 тыс. МЕ через 12 ч. Кроме того, на вторые сутки лечения ему был проведен ПА (рис. 2а, 2б, 3а, 3б). Больная с диагнозом ГД так же получала лечение с начала вторых суток болезни (рис. 4а, 4б): по 150 тыс. МЕ ПДС через 12 ч, интервал – плазмаферез. Через сутки от начала лечения у неё отмечено прогрессирование воспалительного процесса (рис. 5а, 5б). Это явилось основанием для продолжения лечения более высокими дозами ПДС и повторных сеансов ПА. Лечение этих больных было успешным, удалось предотвратить развитие тяжелых токсических осложнений.



Рис. 1а и 1б. Гипертоническая дифтерия ротоглотки, начало 2-х суток болезни. Плотный отек шеи справа с переходом на лицо, ключица не контурируется, видны петехии в области отека. Тонзиллярный лимфоузел размером 8×12 см, болезненный. Рот полностью не открывается. Видна только часть мягкого неба, выдвинутая вперед из-за отека. На её поверхности – рыхлые глыбки и тяжи однородного фибрина белого цвета. Язычок ущемлен. При более глубоком осмотре удается увидеть верхние полюса небных миндалин, покрытые плотными фибринозными пленками черного цвета (геморрагическое пропитывание).

Дозы сыворотки уменьшались после прекращения прогрессирования и снижения активности местного процесса, что определялось по уменьшению отека слизистых оболочек ротоглотки, отсутствию свежесформирующихся налетов, набуханию сформировавшихся пленок, начинающемуся уменьшению размеров, плотности и болезненности лимфоузла. Лечение сывороткой заканчивалось при значительном уменьшении токсикоза, отека ротоглотки, налетов (остатки налетов должны отторгаться без кровоточивости), лимфаденита.

При токсических формах целесообразно сочетание внутривенного и внутримышечного введения сыворотки. Предупреждение анафилактической реакции или шока у лиц с непереносимостью лошадиного белка осуществлялось в соответствии с «Наставлением по применению противодифтерийной сыворотки». Перед каждым введением сыворотки показано парентеральное введение глюкокортикоидов, 15 – 60 мг по преднизолону, что значительно уменьшает риск анафилактической реакции и сывороточной болезни.

Для внутривенного введения сыворотка разводилась физиологическим раствором в произвольном соотношении (удобно добавлять необходимое количество сыворотки во флакон с раствором). Скорость введения не должна превышать 15 – 20 капель в мин.

Показанием к проведению *экстракорпоральной детоксикации* являлся неблагоприятный прогноз по развитию тяжелых осложнений, сопряженных с угрозой летального исхода, который зависел от формы дифтерии, времени начала лечения антитоксической

сывороткой и возраста больных (дети раннего возраста более чувствительны к дифтерийному токсину).

При гипертоксической дифтерии неблагоприятный прогноз – абсолютный даже при введении ПДС с первых часов болезни. В зависимости от тяжести варианта гипертоксической дифтерии (молниеносная, геморрагическая, токсическая III степени с гипертоксическим компонентом) следует увеличивать количество необходимых сеансов ПА. В основе разграничения вариантов гипертоксической дифтерии лежат различия в скорости прогрессирования симптомов болезни. При токсической дифтерии III степени тяжести неблагоприятный прогноз по тяжелым осложнениям становится реальным со вторых суток болезни, значительно ухудшаясь на 3-и сутки.

Прогноз более отягощен при сочетании токсической дифтерии ротоглотки с другими локализациями дифтерийного процесса. Особенно неблагоприятны сочетания с дифтерией носоглотки, дифтерийной флегмоной кожи (массивное токсинообразование), дифтерийным крупом (гипоксия, усугубляющая метаболические нарушения). Показания к ПА у больных токсической дифтерией II степени тяжести обусловлены сочетанием с другими локализациями дифтерии и противопоказанием к введению ПДС.

Необходимый объем эксфузии плазмы составлял 80 – 100% ОЦП. Детям, особенно с массой до 20 кг, показано проведение плазмафереза на аппаратах с небольшим объемом экстракорпорального контура и замещением на 80 – 100% свежемороженой плазмы.

Таблица 1. Первоначальные дозы ПДС больным токсической дифтерией ротоглотки в условиях циркуляции возбудителя высокой степени токсигенности

Форма дифтерии	Первая доза, тыс. МЕ		Интервал для повторного введения
	детям	взрослым	
Субтоксическая, токсическая I ст.	60–80	80 – 100	12 ч
Токсическая II ст.	100–120	120 – 150	12 ч
Токсическая III ст.	120–150	150	8 – 12 ч
Гипертоксическая	150	150 – 250	8 ч

Таблица 2. Противопоказания для проведения лечебного плазмафереза (ПА)

Абсолютные	Относительные
I. Сердечно-сосудистые, легочные расстройства	
Острые нарушения кровообращения, кровопотери	
Острый инфаркт миокарда Гипертонический криз	Нестабильная гемодинамика Тромбоцитопения (60 – 100 тыс.)
Острое нарушение кровообращения, вызванное тяжелым течением миокардитов, перикардитов, кардиомиопатий, аритмий, декомпенсированными пороками сердца и т.д.	Гипопротеинемия Анемия Нарушения КОС
Хроническая недостаточность кровообращения II–III степени	
Острая дыхательная недостаточность II–III степени	
II. Терминальные состояния	II. Непереносимость белковых препаратов, плазмозамещающих растворов и т.д.
III. Отсутствие сосудистого доступа	III. Язвенно-некротические поражения слизистой ЖКТ.
	IV. Менструация



Рис. 2а и 2б. Гипертоксическая дифтерия, начало 3-х суток, больной за прошедшие сутки получил: ПДС 750 тыс. МЕ, инфузионную терапию в объеме 3000 мл, глюкокортикоиды, антибиотики. Отёк шеи значительно уменьшился, но всё ещё заметен на лице. Рот открыт больше, но миндалины ещё не видны. Уменьшился отёк мягкого нёба. В его нижних отделах остатки фибриновых сероватых складчатых плёнок, часть их отторглась, что сопровождалось кровоточивостью.

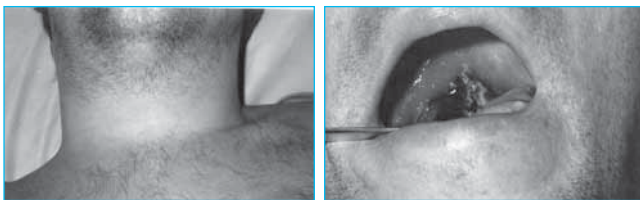


Рис. 3а и 3б. Гипертоксическая дифтерия, начало 4-х суток. За предыдущие сутки больной получил: ПДС 300 тыс.МЕ, ПА с эксфузией плазмы 1500 мл, прежний объем инфузионной и симптоматической терапии. Отёк шеи незначительный. Открытие рта не полное. Стали видны ещё отёчные нижние отделы мягкого нёба, нёбных дужек и язычок, покрытый черным фибриновым налётом.

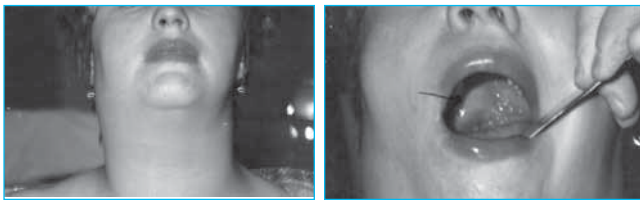


Рис. 4а и 4б. Гипертоксическая дифтерия ротоглотки, начало 2-х суток болезни. Плотный отёк шеи, больше справа с переходом на лицо и заднюю часть шеи. Тонзиллярные лимфоузлы 5х6 см, плотные, болезненные. Болевой тризм, открывание рта затруднено. Осмотру доступна нижняя часть резко отёчного мягкого нёба, край нёбной дужки справа, основание язычка. Слизистые оболочки ярко гиперемированы с цианотичным оттенком. На выпуклой поверхности справа – участок, покрытый нежной вуалеобразной сеткой фибрина.



Рис. 5а и 5б. Гипертоксическая дифтерия, начало 3-х суток болезни. За прошедшие сутки больная получила: ПДС 300 тыс. МЕ, инфузионную и симптоматическую терапию, а так же ПА с эксфузией плазмы 1400 мл. Объем специфической детоксикации оказался недостаточным. Увеличились отёк мягкого нёба, гиперемия и цианоз. В центральной части сформировался плотный фибриновый налёт. Резко усилился отёк шеи, лица, верхних отделов грудной клетки и спины.

Необходимым условием эффективности ПА в комплексной терапии токсической дифтерии является достаточная специфическая детоксикация дифтерийным антитоксином. ПДС должна вводиться больному в соответствии с формой болезни на протяжении 2 – 4 дн. (возможно и дольше) в зависимости от эффективности комплексной терапии. Наряду с внутримышечным введением сыворотки часть ее (не менее половины дозы) перед операцией ПА целесообразно вводить внутримышечно. Обязательно введение ПДС по завершении операции плазмафереза больным, у которых не достигнут положительный клинический эффект.

При токсических формах дифтерии плазмаферез входил в обязательное комплексное лечение по жизненным показаниям, в связи с чем, перечень противопоказаний существенно сокращался. Некоторые состояния (относительные противопоказания): нарушение гемодинамики, дегидратация, гипопропротеинемия и др. можно корректировать до плазмафереза применением соответствующих инфузионно-трансфузионных программ.

Заключение

Эффективное лечение заболеваний дифтерией, сопряженных с риском для жизни, возможно. Оно зависит не только от лечащих врачей, а в целом от организации этой помощи в системе местного здравоохранения. Необходимо обеспечить (организовать) соблюдение обязательных условий:

- раннюю диагностику на догоспитальном этапе и экстренную госпитализацию в специализированный стационар;
- раннее и точное определение степени тяжести заболевания и экстренное начало необходимой терапии, в том числе в реанимационном отделении;
- достаточный объем специфической и экстракорпоральной детоксикации, ургентную терапию в условиях реанимационного отделения.

Для избежания ошибок в диагностике и тактике лечения необходима постоянная ориентировка на состояние очага дифтерийного воспаления, который является ведущим критерием в диагностике и лечении от начала формирования до прекращения активности.

Литература:

1. Гальвидис И.А. Изучение пассивного иммунитета у больных токсическими формами дифтерии: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – 2008. 12 с.
2. Гамалея Н.Ф. Инфекция и иммунитет. Наркомздрав СССР. М. Медгиз. – 1939. – С. 322 – 323.
3. Корженкова М.П., Малышев Н.А., Берко А.И., Арсеньев В.А. Дифтерия (клиника, диагностика, лечение). Методические рекомендации (№ 27). – М. 2008. Часть 1. Клиника. С. 3 – 30. Часть 2. Диагностика, лечение. С. 3 – 24.
4. Корженкова М.П., Свиридов В.В., Берко А.И., Малышев Н.А., Гальвидис И.А., Яковлева И.В., Буркин М.А. Диагностика и лечение токсической дифтерии. Часть 2. Высокие дозы противодифтерийной сыворотки в лечении токсических форм дифтерии // Лечащий врач. – 2010. – № 6. – С. 63 – 67.
5. Корженкова М.П., Малышев Н.А., Максимова Н.М., Маркина С.С., Черкасова В.В., Шестакова О.М., Базарова М.В. Уроки дифтерии // Биопрепараты. – 2011. – № 2. – С. 30 – 35.

Иммунопрофилактика кори в организованных коллективах на этапе элиминации коревой инфекции

¹Никитюк Н.Ф., ²Юревич М.А.

¹ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравоохранения России, Москва

²Областная клиническая больница, Министерство здравоохранения и социального развития Самарской области, Самара

Immunoprophylaxis of Measles in Organized Collectives at the Stage of Measles Virus Infection Elimination

¹Nikityuk N.F., ²Yurevich M.A.

¹Federal State Budgetary Institution «Scientific Center for Expertise of Medical Application Products», Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation

²Regional clinical hospital, Ministry of Health and Social Development of the Samara region, Samara

Организованные коллективы, к которым относятся воинские подразделения, являются контингентами повышенного риска распространения коревой инфекции. В этой связи, одним из наиболее действенных профилактических мероприятий является проведение иммунизации среди военнослужащих против коревой инфекции. С целью оценки эффективности вакцинопрофилактики в воинских коллективах проведены серологические исследования на определение противокоревых антител у военнослужащих в зависимости от возраста и места службы. Результаты серологического скрининга показано, что уровень защищенности от кори среди военнослужащих в среднем составил $74,8 \pm 0,9\%$ с колебаниями от $63,5 \pm 2,0\%$ у военнослужащих по контракту до $78,7 \pm 1,2\%$ у слушателей Самарского военно-медицинского института. У военнослужащих по призыву показатель иммунной прослойки составил $77,5 \pm 1,5\%$. При этом выявлены существенные различия в зависимости от места службы: наименьший показатель определился в Самарском гарнизоне ($70,4 \pm 3,2\%$), наибольший – в Челябинском ($84,0 \pm 2,7\%$). Высокий процент военнослужащих, восприимчивых к коревой инфекции ($25,2 \pm 1,2\%$) в условиях постоянного фактора «перемешивания» позволяет отнести контингенты военнослужащих в группу повышенного риска инфицирования коревой инфекцией. Таким образом, тактика иммунизации военнослужащих против кори должна основываться на дифференцированном подходе в зависимости от возраста, прививочного анамнеза и контингента военнослужащих. При формировании воинских коллективов целесообразно проведение выборочного серологического контроля за состоянием иммунитета к кори для решения вопроса дальнейшей иммунизации военнослужащих.

Ключевые слова: коревая инфекция, вакцинопрофилактика, иммунизация, показатель защищенности, противокоревой иммунитет.

Библиографическое описание: Никитюк Н.Ф., Юревич М.А. Иммунопрофилактика кори в организованных коллективах на этапе элиминации коревой инфекции // Биопрепараты. – 2011. – № 3. – С. 42–44.

Military elements, which belong to organized collectives, are contingent of high-risk of measles infection spread. In this regard one of the most effective preventive measures is immunization of military against measles infection. For the purpose of evaluating the efficacy of vaccine prophylaxis serologic testings to determinate measles antibodies of the military, depending on their age and duty station have been held in military collectives. The results of serologic screening showed that measles protection rate among the military averaged $74,8 \pm 0,9\%$ with variations from $63,5 \pm 2,0\%$ for contract military up to $78,7 \pm 1,2\%$ for the students of Samara Military-Medical Institute. For compulsory military the rate of immune interlayer averaged out at $77,5 \pm 1,5\%$. Herewith significant difference depending on the duty station has been revealed: the lowest rate was detected in Samara military reservation ($70,4 \pm 3,2\%$), the highest – in Chelyabinsk military reservation ($84,0 \pm 2,7\%$). High percentage of the military, susceptible to measles infection ($25,2 \pm 1,2\%$), under the condition of permanent «intermixture» allows to classify military elements as a group of high-risk measles infection. Therefore measles immunization tactics for the military should be based on differentiated approach, depending on the age, immunization history and military contingent. When formatting military collectives it is necessary to perform selective serologic control of measles immunity in order to decide the issue of the military further immunization.

Key words: measles virus infection, vaccinal prevention, immunisation, protection criteria, measles immunity.

Bibliographic description: Nikityuk N.F., Yurevich M.A. Immunoprophylaxis of measles in organized collectives at the stage of measles virus infection elimination // Biopreparats (Biopharmaceuticals). – 2011. – № 3 – P. 42–44.

Для корреспонденции:

Никитюк Н.Ф. – главный эксперт управления экспертизы противобактериальных МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития РФ
 Адрес: ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития РФ,
 119002, Москва, пер. Сивцев Вражек, 41, nikityuk_n@mail.ru
 Статья поступила 10.06.2011 г., принята к печати 25.08.2011 г.

Накопленный мировой опыт специфической профилактики и достигнутые результаты ее проведения позволили Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) поставить задачу элиминации кори. На территории Российской Федерации созданы все условия для предупреждения возникновения случаев кори и ликвидации данной инфекции, о чем свидетельствуют показатели заболеваемости – средний показатель заболеваемости корью за последние 5 лет составил 0,1 на 100 тыс. населения. При низкой интенсивности эпидемического процесса кори возникает острая необходимость в проведении действенного контроля за состоянием противокорревого иммунитета с целью объективной оценки и прогнозирования эпидемической ситуации на территории России.

Учитывая, что организованные коллективы являются контингентами повышенного риска распространения коревой инфекции, воинские подразделения в этой связи имеют особую значимость. Эпидемиологическая опасность распространения коревой инфекции среди военнослужащих обусловлена рядом факторов: возможностью пребывания на приграничных территориях, неблагоприятных по заболеваемости этой инфекцией, постоянным обновлением личного состава, особенностями условий проживания, способствующих в случае возникновения кори ее активному распространению.

Вакцинопрофилактика кори как мероприятие, применительно к воинским контингентам, имеет свои особенности и рассматривается в числе приоритетных направлений здравоохранения Вооруженных Сил Российской Федерации. В условиях реализации Национального календаря профилактических прививок и Программы ликвидации кори на территории РФ, предусмотрена иммунизация против кори лиц до 35-летнего возраста. В этой связи, при формировании воинских коллективов проводится массовая иммунизация против кори, что требует должной эпидемиологической оценки эффективности данного мероприятия.

Принимая во внимание высокую актуальность данной проблемы, **целью нашего исследования** явилось изучение состояния противокорревого иммунитета в коллективах военнослужащих различных возрастных групп и контингентов.

Материалы и методы:

Работа выполнена на базе кафедры общей и военной эпидемиологии Самарского военно-медицинского института, отделов лабораторного контроля ЦГСЭН Челябинска, Оренбурга, Тотько. Были использованы следующие методы: эпидемиологический, серологический, статистический.

Изучение привитости военнослужащих против кори осуществлялось на основании документов: «Медицин-

ская книжка» (ф. 1), «Донесение по медицинской службе» (ф. 1/мед), «Медицинский отчет о состоянии здоровья личного состава и деятельности медицинской службы» (ф. 3/мед), Журнал учета профилактических прививок.

За период 2005 – 2009 гг. методом случайной выборки серологически обследовано 2467 военнослужащих, проходящих службу в воинских частях гарнизонов: Самарского (371 человек), Оренбургского (292 человека), Тотького (186 человек), Челябинского (319 человек), Екатеринбургского (137 человек). Кроме того, обследовано 1162 слушателя 5, 6, 7 курсов, обучавшихся в Самарском военно-медицинском институте [3, 4].

Изучение состояния иммунитета к кори у военнослужащих осуществляли с помощью сравнительного анализа серологического скринингового и мониторингового обследований методом сопоставления результатов с данными прививочного анамнеза.

Оценку состояния иммунитета к кори среди военнослужащих проводили по результатам определения специфических антител в сыворотках крови в реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) микрометодом с эритроцитарным коревым диагностикумом. Активность эритроцитарного диагностикума при постановке реакции определялась титрами со стандартными сыворотками и составила 1:640 – 1:1280. Результаты подвергались обработке с помощью статистического анализа с применением программы «Statistica 6.0».

Результаты и обсуждение

Средний показатель защищенности от кори у военнослужащих составил $74,8 \pm 0,9\%$, что в сравнении с нормативным показателем (не менее 95%-98%) крайне недостаточно для обеспечения специфической защиты от данной инфекции [5]. При изучении иммунитета к кори среди различных контингентов военнослужащих было показано, что у военнослужащих по призыву данный показатель был несколько выше и составил $77,5 \pm 1,5\%$. При этом выявлены существенные различия в зависимости от места службы: наименьший показатель ($70,4 \pm 3,2\%$) определился в Самарском гарнизоне, наибольший ($84,0 \pm 2,7\%$) – в Челябинском.

Защищенность от кори военнослужащих по контракту, в сравнении с другими контингентами был значительно ниже и составил в среднем $63,5 \pm 2,0\%$. В зависимости от гарнизона данный показатель претерпевает колебания от $49,3 \pm 4,3\%$ (Челябинский гарнизон) до $77,7 \pm 3,8\%$ (Оренбургский гарнизон) ($p < 0,006$). Кроме того, отмечена выраженная тенденция к существенному снижению показателей противокоревой защиты с возрастом – от $69,2 \pm 2,8\%$ в группе 23 – 32 г до $57,9 \pm 2,9\%$ в группе 33 – 42 г ($p < 0,004$).

У слушателей Самарского военно-медицинского института состояние противокорревого иммунитета по результатам скринингового обследования также оценено как неудовлетворительное. Показатель иммунной прослойки в среднем составил $78,7 \pm 1,2\%$ с колебаниями от $75,1 \pm 3,2\%$ у 23-летних до $85,9 \pm 3,9\%$ у 27-летних слушателей. Отмеченная тенденция к некоторому улучшению защищенности от кори с возрастом связана, на наш взгляд, с возможностью естественной иммунизации после перенесенного заболевания, что требует более детального изучения. Отсутствие сведений о «документированной» привитости у слушателей затрудняет проведение оценки в отношении качества организации прививочной работы на территории проживания, а также по месту их предыдущей учебы. При данной ситуации не представляется возможным сопоставить результаты серологических исследований с данными прививочного анамнеза.

Таким образом, на основании полученных результатов серологического скрининга, среди всех обследованных категорий военнослужащих выявлен значительный удельный вес серонегативных лиц, что позволяет отнести их к группе повышенного риска инфицирования коревой инфекцией. Высокий процент военнослужащих, восприимчивых к коревой инфекции ($25,2 \pm 1,2\%$) в условиях постоянного присутствия фактора «перемешивания» и с учетом особенностей проживания в воинских коллективах, при возможной активизации эпидемического процесса, будет способствовать возникновению и распространению заболеваемости корью.

Литература:

1. Никитюк Н.Ф., Юревич М.А. Оценка состояния иммунитета к кори у военнослужащих // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – М., 2008 – №2 (39) – С. 37 – 39.
2. Никитюк Н.Ф., Юревич М.А. Зависимость проявлений эпидемического процесса коревой инфекции от иммунопрофилактики // Сб. трудов Всерос. науч. конф. «Эпидемиология, лабораторная диагностика и профилактика вирусных инфекций». – С-Петербург. 2005 – С. 252 – 253.
3. Юревич М.А., Никитюк Н.Ф. Состояние иммунитета

В связи с этим, первоочередной задачей реализации Программы по ликвидации кори среди военнослужащих является выполнение мероприятий по повышению охвата вакцинацией живой коревой вакциной военнослужащих до 35-летнего возраста. При оценке эффективности проводимой иммунизации необходим серологический контроль за состоянием противокорревого иммунитета у военнослужащих с целью коррекции тактики вакцинопрофилактики.

Выводы:

1. Уровень защищенности военнослужащих от кори в среднем составил $74,8 \pm 0,9\%$ с колебаниями от $63,5 \pm 2,0\%$ у военнослужащих по контракту до $78,7 \pm 1,2\%$ у слушателей Самарского военно-медицинского института.
2. Высокий уровень обследованных с серонегативными значениями противокорревых антител (от $25,2\%$ до $36,5\%$) позволяет отнести контингенты военнослужащих в группу повышенного риска инфицирования.
3. Тактика иммунизации военнослужащих против кори должна основываться на дифференцированном подходе в зависимости от возраста, прививочного анамнеза и контингента военнослужащих.
4. При формировании воинских коллективов рекомендуется проведение выборочного серологического контроля за состоянием иммунитета к кори, по результатам которого определяется дальнейшая тактика иммунизации военнослужащих.

к кори у слушателей Сам ВМИ // Сб. тезисов и статей научно-практич. конф. СамВМИ – Самара, 2008 – С. 273 – 275.

4. Юревич М.А. Особенности организации и проведения иммунопрофилактики дифтерии, столбняка и кори у военнослужащих: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Пермь, 2009. – 22 с.
5. Приказ № 270 Минздравсоцразвития РФ от 19.08.2002 г. «Об утверждении программы ликвидации кори на территории Российской Федерации к 2010 году».

Общие принципы разработки программы доклинических испытаний иммунобиологических лекарственных препаратов, полученных с использованием методов генной инженерии

Авдеева Ж.И., Алпатова Н.А., Волкова Р.А., Борисевич И.В.
ФГБУ «ГИСК им. Л.А. Тарасевича» Минздравсоцразвития РФ, Москва

General Principles of Preclinical Trials Program Development for Immunobiological Preparations, Derived Using Gene Engineering Methods

Avdeeva Zh.I., Alpatova N.A., Volkova R.A., Borisevich I.V.
Federal State Budgetary Institution «Tarasevich State Research Institute of Standardization and Control of Biological Medicines», Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation

В статье изложены общие принципы разработки программы доклинических испытаний новых иммунобиологических препаратов, активным веществом которых являются продукты, изготовленные методами рекомбинантной ДНК. Приведены требования к производству, к продукту на этапе разработки и проведения доклинических испытаний препарата, которые включают оценку физико-химических свойств, специфической иммунобиологической активности, токсичности, иммунологической безопасности, иммуногенности, влияния на репродуктивную функцию и эмбриогенез. Изложенные принципы доклинических испытаний касаются препаратов цитокинов, моноклональных антител, рецепторов клеток, рекомбинантных факторов плазмы крови, вакцин на основе рекомбинантных белков (HBsAg, белки вируса папилломы и др.).

Ключевые слова: иммунобиологические препараты, генная инженерия, биотехнология, рекомбинантные белки, доклинические испытания, эффективность, безопасность.

Библиографическое описание: Авдеева Ж.И., Алпатова Н.А., Волкова Р.А., Борисевич И.В. Общие принципы разработки программы доклинических испытаний иммунобиологических лекарственных препаратов, полученных с использованием методов генной инженерии // Биопрепараты. – 2011. – № 3. – С. 45–48.

The following article describes general principles of preclinical trials program development for new immunobiological preparations, the active substances of which have been produced using recombinant DNA method. The following demands are represented: the manufacture, the product at development and preclinical studies stages, which includes physical and chemical properties evaluation, specific immunobiological activity, toxicity, immunological safety, immunological potency, influence on reproductive function and embryogenesis. The stated principles of preclinical trials are applied to cytokine preparations, monoclonal antibodies, cell receptors, recombinant blood plasma factors, vaccines, based on recombinant proteins (HBsAg, papilloma virus proteins etc.).

Keywords: immunobiological preparations, gene engineering, biotechnology, recombinant protein, preclinical trials, efficacy, safety.

Bibliographic description: Avdeeva Zh. I., Alpatova N. A., Volkova R. A., Borisevich I.V. General principles of preclinical trials program development for immunobiological preparations, derived using gene engineering method // Biopreparats (Biopharmaceuticals). – 2011. – № 3 – P. 45–48.

Для корреспонденции:

Авдеева Ж.И. – заведующая лаборатории иммунологии ФГУН «ГИСК им. Л.А. Тарасевича» Минздравсоцразвития РФ
Адрес: ФГБУ «ГИСК им. Л.А. Тарасевича» Минздравсоцразвития РФ,
119002, Москва, пер. Сивцев Вражек, 41, Avd-cytok@yandex.ru
Статья поступила 05.08.2011 г., принята к печати 25.08.2011 г.

В клинической практике в настоящее время все более широкое применение находят иммунобиологические лекарственные препараты, разработанные на основе рекомбинантных белков. Действующим веществом указанных препаратов являются активные субстанции, получаемые из культур охарактеризованных клеток, используемых в качестве систем экспрессии, которыми могут быть бактерии, дрожжи, клетки млекопитающих и др. Активные субстанции – белки, пептиды, их производные и вещества, компонентами которых они являются. К таким препаратам, в частности, относятся препараты цитокинов, моноклональных антител, рецепторов клеток, рецепторные антагонисты цитокинов, рекомбинантных факторов плазмы крови, вакцины на основе рекомбинантных белков (НВsAg, белки вируса папилломы и др.)

Указанные препараты предназначены для лечения, профилактики и диагностики различных заболеваний человека, характеризующихся длительным прогрессирующим течением – инфекционных, аутоиммунных, онкологических, аллергических заболеваний.

Основная цель доклинических испытаний – оценка безопасности, специфической активности, предполагаемой эффективности препарата для решения вопроса о проведении клинических испытаний и последующей регистрации препарата. Заключение о возможности испытания препарата на людях должно основываться на оценке соотношения безопасности и эффективности при его доклиническом исследовании [1, 2].

При проведении доклинических испытаний должны быть выполнены следующие исследования

- оценка физико-химических и иммунохимических свойств активной субстанции и готового препарата,
- изучение специфической биологической активности,
- оценка эффективности, т.е. характеристика специфического проявления действия препарата с целью выяснения механизмов его терапевтического эффекта,
- определение безопасных и эффективных доз и схемы введения препарата, рекомендуемых для человека,
- определение потенциальных органов-мишеней побочного действия препарата и исследование обратимости выявленных токсических эффектов,
- определение параметров безопасности, показателей возможного побочного действия препарата, которые следует оценивать при дальнейшем клиническом испытании.

В досье, представляемом для регистрации препарата, в раздел доклинического изучения должны быть включены как результаты оценки специфической иммунобиологической активности, эффективности и безопасности лекарственного препарата, так и сведения, касающиеся источника клеток-продуцентов, характеристика экспрессирующей конструкции, ее генетическая стабильность и продуктивность.

Препарат, используемый для проведения доклинических испытаний, должен быть достаточно полно оха-

рактеризован по химическим, иммунохимическим и физико-химическим параметрам, включая вторичную и третичную структуру белка (активной субстанции).

В доклинических исследованиях должны исследоваться препараты с установленными спецификациями на активную субстанцию и готовый препарат; показатели, выбранные для контроля, должны обеспечивать необходимое качество продукта.

Для получения рекомбинантного белка должна использоваться система банков клеток, включающая Основной (ОБК) и Рабочий (РБК) банки клеток, аттестованные в установленном порядке.

Сведения о банках клеток, включенные в паспорт, должны содержать следующую информацию:

- детальное описание истории создания клеточной линии и получения банков клеток, включая методы и реагенты, использованные в процессе культивирования, возраст клеток *in vitro*, условия их хранения и стабильность;
- указание фенотипических и генетических маркеров;
- детальное исследование экспрессирующей конструкции в ОБК;
- способ введения вектора в клетку хозяина;
- способы индукции и контроля уровня экспрессии;
- отсутствие в банке онкогенных и посторонних инфекционных агентов: вирусов, бактерий, грибов, микоплазм;
- отсутствие у клеточных линий туморогенности и онкогенности.

Если ОБК не используется, исследования должны проводиться для каждого РБК.

В клетках ОБК, РБК и послепроизводственного банка клеток (ПБК) должны отсутствовать посторонние агенты (вирусные, бактериальные, грибковые, микоплазменные), что должно быть подтверждено соответствующими исследованиями.

Особое внимание следует обращать на вирусы, которые могут контаминировать виды животных, от которых получена линия клеток. Используемые в процессе производства материалы биологического происхождения также должны быть охарактеризованы и должны соответствовать требованиям микробиологической и вирусной безопасности. В частности, сыворотка крупного рогатого скота должна контролироваться и не должна содержать потенциально опасные вирусы (вирус бычьей диареи, инфекционного бычьего ринотрахеита и парагриппа 3 и др.). Кроме того, бычья сыворотка и другие биологические продукты животного происхождения должны быть получены от животных, содержащихся в хозяйствах, благополучных в отношении губчатой энцефалопатии.

Среда, используемая для культивирования клеток, должна иметь регламентированный состав и быть зарегистрирована. Все этапы процесса производства должны быть валидированы с целью предотвращения возможной контаминации инфекционными агентами готового продукта.

С помощью соответствующих тестов, выполняемых на различных стадиях производства, следует доказать отсутствие вирусной контаминации в соответствии с Методическими рекомендациями [3, 4].

Определенные линии клеточных культур могут содержать эндогенные вирусы, например, ретровирусы, которые трудно удалить. Если линия клеток содержит вирусы, способные инфицировать клетки человека, она может быть использована для производства продукта только при исключительных обстоятельствах на основе анализа рисков. Вопрос об использовании таких линий клеток должен рассматриваться индивидуально в каждом конкретном случае. При этом необходимо представить доказательства, что вирусная контаминация будет удалена или инактивирована на этапах производственного процесса. Используемые способы инактивации/удаления вирусных контаминантов не должны влиять на биологическую активность продукта.

При изучении специфической иммунобиологической активности новых генно-инженерных препаратов и последующей разработке требований к ним необходимо основываться на принципах, изложенных в Методических рекомендациях [1, 3], а также международных рекомендаций [5 – 7]. Для определения специфической активности препаратов должны использоваться соответствующие информативные лабораторные методы.

Принципы оценки активности генно-инженерных препаратов, предназначенных для активной иммунизации человека (вакцины), должны быть основаны на определении степени иммунного ответа у экспериментальных животных, иммунизированных данными препаратами, обеспечивающего защиту от специфического патогена.

При оценке специфической иммунобиологической активности лекарственных препаратов, активным компонентом которых являются генно-инженерные продукты, используют методы *in vitro* и *in vivo*, которые позволяют оценить эффекты, отражающие механизм действия препаратов при их клиническом использовании.

Целью проведения исследований *in vitro* является выбор соответствующих видов животных для дальнейших иммунобиологических, а также и токсикологических исследований, проводимых в условиях *in vivo*. Особую значимость выбор соответствующих видов животных имеет при проведении доклинических испытаний препаратов моноклональных антител.

В тестах *in vitro* используют перевиваемые клеточные линии и/или первичные клеточные культуры для определения локализации рецепторов на клетках, аффинитета рецепторов с целью выявления и изучения иммунобиологических эффектов, которые в последующем могут выявляться при проведении исследований в условиях *in vivo* и определять потенциальные аспекты биологической активности препаратов.

При испытании моноклональных антител должны быть детально изучены иммунологические свойства антител, включая антигенную специфичность, способность связывать комплемент, а также реактогенность и/или цитотоксичность в отношении тканевых антигенов человека, не являющихся мишенями для антител заданной специфичности. Исследования перекрёст-

ной реактивности должны проводиться на тканях различных органов человека с использованием соответствующих иммуногистохимических методов.

При исследовании токсичности лекарственных генно-инженерных препаратов традиционные подходы, используемые для других МИБП, не всегда применимы в связи с их уникальностью – особенностью структуры и биологических свойств, включающих иммуногенность, плейотропную активность и видовую специфичность.

Это касается в первую очередь выбора животных, поскольку видовая и/или тканевая специфичность затрудняет проведение исследования токсичности по стандартной схеме на традиционно используемых видах животных.

Другие общие принципы испытания токсичности, касающиеся схемы исследования, количества и пола животных, способа и кратности введения препарата, соответствуют принципам исследования других МИБП и максимально приближены к предполагаемой схеме применения препарата в клинике.

В большей степени особенности проведения исследований касаются препаратов моноклональных антител (МкАТ).

Исследования препаратов МкАТ могут быть проведены только на тех видах животных, клетки тканей которых экспрессируют антигены, эпитопы которых распознаются препаратом МкАТ, либо ткани которых проявляют перекрёстную реактивность с тканями человека, т.е. на соответствующих видах животных.

Если соответствующий вид животных отсутствует, используют трансгенных животных, клетки тканей которых экспрессируют человеческий рецептор, или используют гомологичные белки соответствующего вида животных.

В случае, когда препарат МкАТ, специфичных к эпитопу антигена, экспрессированного на клетках человека, имеет перекрёстную реактивность с соответствующим эпитопом только на клетках человекообразных обезьян, но не реагирует с эпитопами на клетках грызунов, исследования проводят на обезьянах, либо готовят аналогичный препарат МкАТ, которые реагируют с тканями грызунов и используют их в испытаниях.

Оценка потенциальной иммуногенности и иммунотоксичности проводится при испытании токсичности (в случае многократного введения препарата), при этом необходимо контролировать уровень специфических антител, оценивать их влияние на параметры фармакокинетики/фармакодинамики, частоту и/или тяжесть побочных эффектов, активацию системы комплемента или новые проявления токсичности, необходимо учитывать возможность развития патологических изменений за счет формирования и отложения иммунных комплексов.

Следует отметить, что у человека не всегда формируются антитела к рекомбинантному белку. Однако, даже в случае формирования антител, терапевтический эффект препарата у пациентов может сохраняться. Развитие тяжёлых анафилактических реакций на рекомбинантные белки у человека наблюдается редко.

Необходимо учитывать, что проявление иммунотоксичности препарата может быть следствием изменения экспрессии антигенов на клетках-мишенях, в част-

ности, маркеров активации, что может провоцировать включение аутоиммунных процессов.

Необходимость проведения исследований по изучению влияния на репродуктивную функцию и эмбриогенез зависит от конкретного препарата, клинических показаний и предполагаемой популяции пациентов. Исследование мутагенности должны выполняться в случае сомнений по поводу мутагенных свойств препарата.

Проведение стандартных исследований при изучении канцерогенности, в целом, не являются необходимыми. Необходимость оценки канцерогенного потенциала, специфичного для препарата, находится в зависимости от длительности курса его применения, популяции пациентов и/или биологической активности (препараты факторов роста, вещества с иммуносупрессивной активностью и др.).

Следует обратить внимание на вопросы, требующие особого рассмотрения. Так, единая схема проведения фармакокинетических исследований медицинских препаратов, полученных методами генной инженерии, не установлена. Рутинные исследования, когда оценивается баланс массы введенного и элиминированного препарата, мало информативны. На фармакокинетический профиль (величину клиренса) могут влиять иммунологически обусловленные механизмы, кроме того может проявляться отсроченный фармакодинамический эффект (в частности это касается цитоки-

нов), т.е. может наблюдаться пролонгирование фармакодинамических эффектов. Параметры фармакокинетики препаратов МкАТ должны оцениваться только на соответствующих видах животных.

При исследовании фармакокинетических параметров следует учитывать влияние связывающих белков плазмы и/или антител, циркулирующих в сыворотке крови, которые могут ингибировать проявления оцениваемой активности препарата.

Следует учитывать также особенности метаболизма рекомбинантных белков в случае исследования белкового препарата с радиоактивной или любой другой меткой. Так, следствием активного метаболизма меченного белкового препарата является деградация до коротких пептидов и отдельных аминокислот, что приводит к потере радиоактивной метки, либо включению метки в определенные аминокислоты, которые могут участвовать в синтезе белков/пептидов, не имеющих отношения к исследуемому препарату.

Таким образом, результаты доклинических испытаний иммунобиологических препаратов, получаемых с использованием методов генной инженерии, должны включать оценку физико-химических, иммунохимических свойств, специфической иммунобиологической активности, иммуногенности, токсичности, иммунологической безопасности, и являться основанием для решения вопроса о возможности проведения I фазы клинических испытаний (оценки реактогенности, безопасности, специфической активности (эффективности) препарата на ограниченной группе людей).

Литература:

1. РД 42 – 28 – 9 – 89 «Общие требования к медицинским иммунобиологическим препаратам, полученным методами генной инженерии». – 1988.
2. МР 3.3.2.2359-08 «Организация производства и контроль качества моноклональных антител». – 2009. – 36 с.
3. МР «Доклинические испытания эффективности и безопасности новых медицинских иммунобиологических препаратов». – 2010. – 39 с.
4. МР «Аттестация перевиваемых клеточных культур». – 2011. – 65 с.
5. WHO guidelines for assuring the quality of pharmaceutical and biological products prepared by recombinant DNA technology/ WHO Technical Report Series. № 814. – 1991.
6. Production and Quality Control of Medicinal Products Derived by Recombinant DNA Technology. European Commission. Enterprise Directorate-General – Pharmaceuticals. – 1994.
7. WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines/ WHO Technical Report Series. № 927. – 2005.

Требования к характеристике экспрессирующей конструкции и очищенного белка при проведении доклинических испытаний иммунобиологических лекарственных препаратов, полученных с использованием методов генной инженерии

Волкова Р.А., Авдеева Ж.И., Эльберт Е.В., Алпатова Н.А., Борисевич И.В.
ФГБУ «ГИСК им. Л.А. Тарасевича» Минздравсоцразвития РФ, Москва

The Requirements to Characteristics of Expressing Structure and Refined Protein for Performing Preclinical Trials of New Immunobiological Preparations, Derived Using Gene Engineering Methods

Volkova R.A., Avdeeva Zh.I., El'bert E.V., Alpatova N.A., Borisevich I.V.
Federal State Budgetary Institution «Tarasevich State Research Institute of Standardization and Control of Biological Medicines», Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation

В статье изложены общие требования к характеристикам экспрессирующей конструкции и очищенного белка в соответствии с рекомендациями ВОЗ и ICH, которые должны быть включены в отчет о доклинических испытаниях новых иммунобиологических препаратов, изготовленных методами рекомбинантной ДНК. Изложенные требования касаются препаратов, активным веществом которых являются белки, пептиды, или производные белков и пептидов (цитокины, моноклональные антитела, рецепторы клеток, рекомбинантные факторы плазмы крови, вакцины на основе рекомбинантных белков – HBsAg, белков вируса папилломы и др.). Экспрессирующая конструкция должна быть охарактеризована с помощью методов исследования нуклеиновых кислот, приведена история ее создания, а также данные по ее стабильности. Получаемые целевые белки также должны быть охарактеризованы для подтверждения соответствия продукту рекомбинантной ДНК как в отношении первичной структуры (аминокислотная последовательность N- и C-концов белка, пептидное картирование), так и в отношении химических, иммунохимических и физико-химических параметров, включая вторичную и третичную структуру белка. Чистота белка должна быть не менее 95 %. Должно быть изучено содержание модифицированных, полимеризованных и деградированных форм рекомбинантного белка, а также содержание неспецифических примесей (веществ, использованных при получении и очистке целевого продукта). Содержание примеси белков и нуклеиновых кислот штамма-производителя должно обеспечивать безопасность препарата и устанавливается для каждого конкретного препарата. Необходимость подробной характеристики экспрессирующей конструкции и очищенного белка обусловлена тем, что результаты доклинического изучения должны быть связаны с конкретным очищенным продуктом, а при оценке безопасности препарата используемые методы во многом обусловлены присутствием в нем конкретных примесей или контаминантов.

Ключевые слова: иммунобиологические препараты, экспрессирующая конструкция, биотехнология, рекомбинантные белки, доклинические испытания.

Библиографическое описание: Волкова Р. А., Авдеева Ж.И., Эльберт Е.В., Алпатова Н.А., Борисевич И.В. Требования к характеристике экспрессирующей конструкции и очищенного белка при проведении доклинических испытаний иммунобиологических лекарственных препаратов, полученных с использованием методов генной инженерии // Биопрепараты. – 2011. – № 3. – С. 49–52.

The following article describes the general requirements to characteristics of expressing structure and refined protein according to WHO and ICH recommendations, which should be included in the report of preclinical trials of new immunobiological preparations, derived using recombinant DNA

methods. The listed requirements are applied to the preparations, which contain proteins, peptides or their derivatives (cytokines, monoclonal antibodies, cell receptors, recombinant blood plasma factors, vaccines based on recombinant proteins – HbsAg, papilloma virus proteins etc.) as an active substance. Expressing construction should be characterized using methods of testing nucleic acids, it's creation history should be represented as well as it's stability data. Target proteins derived should also be characterized for confirmation of recombinant DNA product conformity in terms of primary structure (amino acid sequence of N- and C-terminus, peptide mapping) and also in term of chemical, immunochemical and physical and chemical characteristics, including secondary and tertiary structure of protein. Protein purity should be not less than 95%. The content of modified, polymerized and degraded forms of recombinant protein should be examined, as well as the content of non-specific impurities (substances, used in downstream processing). The content of proteins and nucleic acids of producer strain should ensure the preparation's safety and is being set for each preparation separately. The reason for the requirement of the detailed characteristics of an expressing construction and refined protein is that the results of preclinical trials should relate to the concrete refined product and the methods used for assessing preparation's safety are in many ways stipulated by the fact whether it contains impurities or contaminants.

Keywords: immunobiological preparations, expressing construction, biotechnology, recombinant proteins, preclinical trials.

Bibliographic description: Volkova R.A., Avdeeva Zh.I., El'bert E.V., Alpatova N.A., Borisevich I.V. The requirements to characteristics of expressing structure and refined protein for performing preclinical trials of new immunobiological preparations, derived using gene engineering methods // Biopreparats (Biopharmaceuticals). – 2011. – № 3 – P. 49–52.

Для корреспонденции:

Волкова Р.А. – заведующая лабораторией биохимии ФГБУ «ГИСК им. Л.А. Тарасевича» Минздравсоцразвития РФ
Адрес: ФГБУ «ГИСК им. Л.А. Тарасевича» Минздравсоцразвития РФ,
119002, Москва, пер. Сивцев Вражек, 41, raузavolkova@yandex.ru
Статья поступила 02.08.2011 г., принята к печати 25.08.11 г.

В клинической практике в настоящее время широко используются препараты цитокинов, интерферонов, моноклональных антител, рецепторов клеток, рекомбинантных факторов плазмы крови, а также вакцины на основе рекомбинантных белков – HbsAg, белков вируса папилломы и др. Активной субстанцией этих препаратов являются рекомбинантные белки, пептиды и их производные, которые получают с помощью систем экспрессии на основе бактерий, дрожжей, клеток млекопитающих и др.

Основная цель доклинических исследований – оценка безопасности, специфической активности, предполагаемой эффективности препарата для решения вопроса о проведении клинических испытаний и последующей регистрации препарата [1 – 3, 11].

Информативность указанных исследований определяется степенью изученности физико-химических и иммунохимических свойств активной субстанции и готового препарата, а также охарактеризованными клетками-продуцентами.

В соответствии с отечественными и международными рекомендациями в досье, представляемое для регистрации препарата, в раздел доклинического изучения должны быть включены сведения, касающиеся характеристики экспрессирующей конструкции и очищенного рекомбинантного белка (активной субстанции) [1, 5, 7, 9, 10]. В доклинических исследованиях должны испытываться препараты с установленными спецификациями на активную субстанцию и готовый препарат, показатели, выбранные для контроля, должны обеспечивать необходимое качество продукта [1, 5, 10]. Для получения рекомбинантного белка должна использоваться система банков клеток, которые должны быть аттестованы в установленном порядке [4, 6, 8].

Характеристика экспрессирующей конструкции.

Цель оценки экспрессирующей конструкции – подтверждение того, что в клетку-хозяина введена нуклеотидная последовательность, соответствующая требуемому белку, и что она сохраняется в клеточной культуре до конца продуктивного периода

Экспрессирующая конструкция, содержащая кодирующую последовательность рекомбинантного белка, должна быть охарактеризована с помощью методов исследования нуклеиновых кислот.

Оценку экспрессирующей конструкции на уровне нуклеиновой кислоты необходимо рассматривать как часть оценки качества. Следует учитывать, что эта проверка относится только к кодирующей последовательности рекомбинантного гена и не отвечает ни за точность его трансляции, ни за другие характеристики рекомбинантного белка, такие как вторичная и третичная структура или посттрансляционные модификации.

Необходимость оценки экспрессирующей конструкции диктуется возможностью возникновения мутаций в последовательности генов рекомбинантного белка, продуцируемого в живых клетках, что может изменять его свойства и привести к негативным последствиям при использовании готового лекарственного препарата, полученного на основе данного белка. Аналитическая методика для установления нуклеотидной последовательности гена должна быть охарактеризована в отношении предела обнаружения измененной последовательности. Такой анализ необходим, поскольку методы анализа белков не всегда позволяют обнаружить все изменения в структуре белка, возникающие в результате мутаций.

Анализ нуклеотидной последовательности может быть использован для проверки кодирующей последовательности и физического состояния экспрессирующей конструкции. Этот анализ проводится для подтверждения того, что экспрессируемый белок будет иметь правильную аминокислотную последовательность, но не направлен на обнаружение низких уровней измененных последовательностей. Если продуцирующие клетки несут множественные встроенные копии экспрессирующей конструкции, не все из которых могут быть транскрипционно активны, проверка собственно продукта транскрипции путём анализа мРНК или кДНК иногда оказывается более информативной, чем анализ геномной ДНК. Исследование суммарных нуклеиновых кислот, например, материала, амплифицированного в полимеразной цепной реакции, можно рассматривать как альтернативу подходам, основанным на отборе индивидуальных клонов ДНК. При исследовании могут быть использованы и другие научно обоснованные методы, позволяющие быстро и с высокой точностью подтвердить кодирующую последовательность рекомбинантного белка в экспрессирующей конструкции.

В отношении конструкции гена, кодирующего рекомбинантный белок, должны быть представлены следующие сведения:

- информация о линии клеток и векторах, используемых в продуцировании рекомбинантного белка,
- описание источника нуклеотидной последовательности, кодирующей целевой белок, методов получения ДНК, кодирующей целевой белок,
- описание стадий сборки экспрессирующей конструкции, включающее происхождение и функцию составных частей экспрессирующей конструкции, как, например, точки начала репликации, гены устойчивости к антибиотикам, промоторы, энхансеры, является ли белок белком слияния,
- методы, используемые для введения вектора в клетку-хозяина, отбор и клонирование трансформантов, критерии отбора,
- состояние вектора внутри клетки-хозяина,
- нуклеотидные последовательности целевых генов и фланкирующих регуляторных областей векторов экспрессии. Должны быть указаны области, секвенированные в процессе конструирования, и области, последовательности которых указаны на основании данных литературы. Последовательности мест соединения составных частей экспрессирующей конструкции при использовании лигирования должны быть подтверждены секвенированием,
- материалы исследования с использованием различных рестриктаз и методов саузэрн-блот или норзерн-блот, подтверждающие включение вектора в клетку хозяина,
- описание метода индуцирования экспрессии соответствующего гена и контроля ее в процессе производства,
- идентификация всех известных экспрессирующих последовательностей,
- указание любых дополнительных модификаций.

Клетки-продуценты должны быть охарактеризованы по генетической стабильности. Предел возраста для

клеток-продуцентов *in vitro* устанавливаются на основе изучения клеток, культивируемых в условиях пилотного производства до предполагаемого возраста и старше, и подтверждают в дальнейшем в условиях полномасштабного производства. Экспрессирующая конструкция клеток-продуцентов исследуется в соответствии с положениями, изложенными выше, при этом кодирующая последовательность может быть подтверждена либо исследованием нуклеиновой кислоты, либо анализом целевого белкового продукта.

При оценке стабильности генетические и фенотипические характеристики системы хозяин/вектор должны исследоваться на материале, полученном до и после установленного возраста клеток-продуцентов *in vitro* (далее подтверждено при полномасштабном производстве). Исследования стабильности заключаются в получении информации о копийности гена, уровне и постоянстве экспрессии белка, характеристике рекомбинантного белка на уровне белка и/или последовательности ДНК (при использовании любого метода должен быть указан предел обнаружения отклонений от установленных параметров на основе проведенной валидации методики).

Любое увеличение ранее установленного предела возраста клеток-продуцентов *in vitro* должно быть обосновано данными, полученными на клетках, которые культивировались до возраста клеток *in vitro*, равного или превышающего новый предел возраста клеток *in vitro*.

Характеристика очищенных белков. Получаемые целевые белки должны быть охарактеризованы для подтверждения соответствия продукту рекомбинантной ДНК.

Единого экспериментального подхода, который мог бы обнаружить все возможные изменения в белке, не существует. Методы анализа белка могут включать определение аминокислотной последовательности, структурных особенностей, возникающих в результате посттрансляционных модификаций, таких как протеолиз, гликозилирование, фосфорилирование, ацетилирование.

Препарат, используемый для проведения доклинических испытаний, должен быть достаточно полно охарактеризован по химическим, иммунохимическим и физико-химическим параметрам, включая вторичную и третичную структуру белка. Это обусловлено тем, что, во-первых, результаты доклинического изучения должны быть связаны с конкретным очищенным продуктом, во-вторых, при оценке безопасности препарата используемые методы во многом обусловлены присутствием в нем конкретных примесей или контаминантов. При проведении данных исследований характеризуют очищенный белок – субстанцию препарата, в которой оценивают молекулярную массу, первичную (в том числе N- и C – концевые последовательности, замены аминокислот), вторичную и третичную структуры белка, содержание белка, чистоту активного вещества, содержание модифицированных, полимеризованных и деградированных форм рекомбинантного белка, а также содержание неспецифических примесей (веществ, использованных при получении и

очистке целевого продукта). При необходимости оценивают содержание углеводов и липидов, степень гликозилирования.

Исследования для характеристики очищенного белка должны включать широкий спектр аналитических методов, например, электрофорез в полиакриламидном геле с SDS в редуцирующих и нередуцирующих условиях, капиллярный электрофорез, изоэлектрическое фокусирование, высокоэффективную жидкостную хроматографию, пептидное картирование, в том числе в сочетании с масс-спектрометрией, анализ аминокислотной последовательности, круговой дихроизм, углеводное картирование и др.

При производстве необходимо использовать максимально эффективные способы очистки препарата от примесей и контаминантов, поскольку они во многом определяют необходимость проведения исследований по оценке безопасности препарата при доклинических испытаниях.

В отношении неспецифических примесей препарат должен быть охарактеризован по следующим параметрам:

- наличие примеси белков клетки-хозяина (бактерии, дрожжи, клетки млекопитающих и др.) или других гетерологичных белков (например, компонентов питательной среды, носителя для очистки с помощью аффинной хроматографии и т.д.), которые обуславливают потенциальный риск развития аллергических реакций и проявления других иммунопатологических эффектов;
- наличие примеси нуклеиновых кислот штамма-производителя, которая теоретически не исключает

возможность интеграции их в геном клеток организма хозяина;

- отсутствие контаминации вирусами продуктов, полученных из клеток-производителей, содержащих эндогенный вирус.

Поскольку линии клеток, продуцирующие гуманизированные моноклональные антитела, как правило, являются опухолевыми, следует считать перспективным дальнейшее совершенствование требований к ним с точки зрения характеристики продуцируемых белков в отношении онкогенности. Результаты этих исследований позволят целенаправленно оценивать данные белки в препаратах соответствующих антител.

Чистота белка должна быть не менее 95 %. В настоящее время многие производители обеспечивают чистоту не менее 97 %. Допустимое содержание примеси белков и нуклеиновых кислот клеток-производителей устанавливается для каждого конкретного препарата и должно обеспечивать его безопасность.

Перечень изучаемых физико-химических показателей для характеристики продукта, как правило, превышает таковые при включении в нормативную документацию на субстанцию.

Таким образом, характеристика экспрессирующей конструкции и очищенного экспрессируемого белка – обязательные элементы доклинических исследований, необходимые для объективной оценки результатов доклинических испытаний безопасности и эффективности иммунобиологических лекарственных препаратов, полученных с использованием методов геномной инженерии. Полнота характеристик нуклеиновой кислоты и белка может отличаться у различных продуктов, что зависит от доступности используемых методов исследования.

Литература:

1. РД 42-28-9-89 «Общие требования к медицинским иммунобиологическим препаратам, полученным методами геномной инженерии». – 1988
2. МР 3.3.2.2359-08 «Организация производства и контроль качества моноклональных антител». – 2009. – 36 с.
3. МР «Доклинические испытания эффективности и безопасности новых медицинских иммунобиологических препаратов». – 2010. – 39 с.
4. МР «Аттестация перевиваемых клеточных культур». – 2011. – 65 с.
5. ICH Q6B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products. International Conference on Harmonisation. – 1999
6. ICH Q5A Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin. International Conference on Harmonisation. – 1997.
7. ICH Q5B Quality of Biotechnological Products: Analysis of the Expression Construct in Cells Used for Production of R-DNA Derived Protein Products. International Conference on Harmonisation. – 1995.
8. ICH Q5D Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products. International Conference on Harmonisation. – 1997.
9. Production and Quality Control of Medicinal Products Derived by Recombinant DNATechnology. European Commission. Enterprise Directorate-General – Pharmaceuticals. – 1994.
10. WHO guidelines for assuring the quality of pharmaceutical and biological products prepared by recombinant DNA technology/ WHO Technical Report Series. № 814. – 1991.
11. WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines/ WHO Technical Report Series. № 927. – 2005.

Использование жидкой питательной среды из ферментативного гидролизата белков обезжиренного коровьего молока в технологии вакцины чумной живой сухой

Лещенко А.А., Тетерин В.В., Лазыкин А.Г., Ежов А.В., Хонин А.З., Мохов Д.А., Бирюков В.В., Багин С.В., Логвинов С.В.

Научно-исследовательский центр Федерального бюджетного учреждения «33 Центральный научно-исследовательский испытательный институт министерства обороны Российской Федерации», Киров

Using of Liquid Nutrient Medium Prepared from Digestion Proteins Hydrolyzate of Skim Cow Milk by Technologing of Vaccine Plague Live Dry

Leshchenko A.A., Teterin V.V., Lazykin A.G., Ezhov A.V., Khonin A.Z., Mokhov D.A., Birjukov V.V., Bagin S. V., Logvinov S.V.

Biological Defense Research Center of the Federal State Establishment «Russian Federation Ministry of Defense 33 Central Research and Development Testing Institute», Kirov

В статье представлены данные изучения возможности использования жидкой питательной среды из ферментативного гидролизата белков обезжиренного коровьего молока в технологии вакцины чумной живой сухой. Вакцина чумная живая сухая, полученная с использованием данной среды, соответствует предъявляемым к ней требованиям нормативной документации и на 25% дешевле, чем препарат полученный по регламентной технологии.

Ключевые слова: вакцина чумная живая сухая, питательная среда, питательная основа, технология, ферментативный гидролизат белков обезжиренного коровьего молока.

Библиографическое описание: Лещенко А.А., Тетерин В.В., Лазыкин А.Г., Ежов А.В., Хонин А.З., Мохов Д.А., Бирюков В.В., Багин С.В., Логвинов С.В. Использование жидкой питательной среды из ферментативного гидролизата белков обезжиренного коровьего молока в технологии вакцины чумной живой сухой // Биопрепараты. – 2011. – № 3. – С. 53–56.

According to aminoacid, peptide and mineral composition requirements, the liquid nutrient medium prepared from the digestion proteins' hydrolyzate of skim cow milk satisfies the requests of the vaccine's EV strain taken from a plague microbe being deep-cultured. The vaccine plague live dry, received with the help of the specified medium, corresponds to the normative regulations and is 25% cheaper than a preparation received at protocol technology.

Keywords:

Bibliographic description: Leshchenko A.A., Teterin V.V., Lazykin A.G., Ezhov A.V., Khonin A.Z., Mokhov D. A., Birjukov V.V., Bagin S.V., Logvinov S.V. Using of liquid nutrient medium prepared from digestion proteins hydrolyzate of skim cow milk by technologing of vaccine plague live dry // Biopreparats (Biopharmaceuticals). – 2011. – № 3. – С. 53–56.

Для корреспонденции:

А.А. Лещенко – ведущий научный сотрудник Научно-исследовательского центра Федерального бюджетного учреждения «33 Центральный научно-исследовательский испытательный институт министерства обороны Российской Федерации»
Адрес: НИЦФБУ «33 Центральный научно-исследовательский испытательный институт министерства обороны Российской Федерации»

610017 г. Киров, Октябрьский проспект, 119

Статья поступила 17.08.2011 г., принята к печати 25.08.2011 г.

В биотехнологии производства иммунобиологических препаратов (ИБП) важнейшим условием получения полноценного конечного продукта является использование высококачественных питательных сред (ПС).

К основным компонентам ПС, обеспечивающим их питательную ценность, относятся белковые гидроли-

заты, которые традиционно изготавливаются из пищевого (филейная говяжья вырезка) и непищевого (технический казеин, рыбная кормовая мука и т.д.) сырья [1, 2]. При этом доля ПС из непищевого сырья составляет не более 15% от всего ассортимента выпускаемых в мире сред [3].

В этой связи, становятся понятными стремления исследователей, занимающихся конструированием ПС, направленные на поиск непищевого недефицитного белкового сырья, позволяющего изготавливать стандартизованные питательные основы (ПО) и среды.

В настоящее время в качестве основного белкодержавшего сырья в ПС, нашедших применение в технологии вакцины чумной живой сухой используются кислотные гидролизаты казеина [4, 5].

Однако высокая стоимость и ощутимый дефицит казеина на Российском рынке обусловили необходимость разработки технологии ПО и сред, не зависящей от рыночной конъюнктуры.

Следует отметить, что сырьем для производства сухого казеина служит обезжиренное коровье молоко (обрат). Оно является продуктом переработки цельного молока и используется в технологических процессах приготовления пищевых продуктов, а также при подкормке молодняка в животноводческих хозяйствах. Вполне логичным является вопрос возможности замены готового продукта – казеина на полуфабрикат технологии его получения – обрата, с целью применения последнего в качестве сырья для производства белковых гидролизатов. К положительному моменту при решении данного вопроса относится доступность сырья и его не дефицитность [6]. Помимо этого цена гидролизата из обрата молока будет существенно ниже, чем из сухого казеина. Причина заключается в исключении из технологии казеина самой энергозатратной стадии – термического обезвоживания.

Разработанная сотрудниками НИЦ технология ферментативного гидролиза белков обезжиренного коровьего молока (ФГБОКМ) [7] обеспечила получение субстрата, который по аминокислотному, пептидному и минеральному составам не отличается от стандартного кислотного гидролизата из сухого казеина (КГК) и может использоваться для конструирования микробиологических сред.

Цель работы заключалась в оценке возможности использования жидкой ПС, приготовленной из ферментативного гидролизата белков обезжиренного коровьего молока, в технологии вакцины чумной живой сухой.

Материалы и методы:

В работе использовали вакцинный штамм EV чумного микроба линии НИИЭГ из коллекции ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича Роспотребнадзора (инв. № 52), обладающего типичными культурально – морфологическими, биохимическими и фаголизабельными свойствами.

При получении чистой рабочей культуры выполняли последовательные пересевы штамма на плотные и жидкие ПС, которые приготовили на основе перевара Хоттингера. Для инокуляции ферментера готовили посевной материал в глубинной культуре на аналогичной среде. Микробы выращивали при температуре $(27\pm 2)^\circ\text{C}$ в 20-литровых бутылках с 10 л жидкой среды на основе перевара Хоттингера, при аэрации воздухом – 10 л/мин в течение 48 ч.

Культивирование проводили в ферментерах БИОР (Россия) объемом $0,25\text{ м}^3$ с коэффициентом заполнения 0,6. Биореакторы были оснащены магнитными перемешивающими устройствами, фильтрами тонкой очистки воздуха, датчиками температуры, кислотности среды, скорости перемешивания и расхода воздуха на аэрацию.

При глубинном культивировании использовали экспериментальные (на основе ФГБОКМ) и контрольные (на основе КГК) среды, с содержанием аминного азота $(0,110 \pm 0,010)\%$, концентрацией водородных ионов $(7,0\pm 0,2)$ ед. рН. Состав среды включал: ПО, калий фосфорнокислый двузамещенный, калий фосфорнокислый однозамещенный, магния сульфат, натрия хлорид, дистиллированную воду. В качестве добавки использовали 20%-ный раствор натрия тиосульфата, который вводили в ферментер перед внесением посевной культуры [4].

Процесс осуществлялся по следующему режиму: температура $(27\pm 2)^\circ\text{C}$; кислотность среды $(7,1 \pm 0,3)$ ед. рН; скорость непрерывного перемешивания – 176 об/мин, аэрация воздухом – 30 – 35 л/мин; продолжительность – 27 ч.

Параметры кинетики роста культуры рассчитывали по концентрации живых микробов, определяемой методом высева стандартных серийных разведений бактериальных суспензий на агаризованные ПС [8].

Вакцину чумную сухую живую оценивали по физико-химическим и иммунобиологическим свойствам. В ходе работы определяли характеристики качества биопрепарата: внешний вид, растворимость, наличие посторонней микрофлоры, потерю в массе при высушивании, термостабильность, общую концентрацию микробных клеток, концентрацию живых микробных клеток, специфическую безвредность и иммуногенность [4].

Результаты и обсуждение:

Выращивание чумного микроба штамма EV проводили в периодических условиях. В процессе выращивания и по его окончанию из ферментеров отбирали пробы культуральной жидкости, в которых определяли концентрацию живых микробов. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Анализ данных таблицы 1, показал, что экспериментальная ПС, приготовленная на основе ФГБОКМ не оказывала негативного воздействия на рост и накопление биомассы чумного микроба штамма EV. Отсутствие статистически значимых различий в результатах по накоплению биомассы в ферментерах с использованием экспериментальной и контрольной ПС позволили рассчитать и проанализировать параметры кинетики роста культур на данных средах (таблица 2).

Представленные в таблице 2 результаты свидетельствовали о том, что культуры, полученные в ПС из ФГБОКМ и КГК, имеют отличия по основным параметрам кинетики роста. Так, на ряду с близкими величинами равновесной концентрации, культуры чумного микроба штамма EV при выращивании в ПС из ФГБОКМ имели более высокие значения максимальной удель-

Таблица 1. Динамика накопления биомассы чумного микроба штамма EV, в процессе его выращивания в ферментерах вместимостью 0,25 м³ с различными питательными средами ($X \pm I_{95}$, n=6)

Питательная среда на основе ...	Концентрация живых микробов, млрд ж. м. кл.×см ⁻³ , на ? час роста									
	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27
ФГБОКМ	0,5±0,2	0,8±0,3	1,3±0,6	2,5±0,5	4,0±1,0	7,4±0,7	10,8±1,2	14,5±1,9	18,2±3,1	20,9±3,6
КГК _д	0,4±0,2	0,7±0,3	1,1±0,3	3,2±1,0	5,4±0,5	7,1±0,6	8,9±0,8	14,2±1,9	19,4±2,7	21,4±4,7

Таблица 2. Параметры кинетики роста культур чумного микроба штамма EV, выращенных в ферментерах вместимостью 0,25 м³ в различных питательных средах ($X \pm I_{95}$, n=6)

Питательная среда на основе ...	Максимальная удельная скорость роста, ч ⁻¹	Равновесная концентрация, млрд м.кл.×см ⁻³	Максимальная абсолютная скорость роста, млрд м.кл.×см ⁻³ ×ч ⁻¹	Время достижения фазового состояния 95%, ч	Продолжительность одной генерации, ч	Число поколений	Показатель фазового состояния
ФГБОКМ	0,228±0,022	23,5±4,4	1,51±0,2	25,6±3,8	5,0±1,6	5,3±0,8	0,824±0,016
КГК _д	0,194±0,010	27,3±2,6	1,32±0,3	29,9±2,4	7,6±1,3	3,6±0,4	0,786±0,015

Таблица 3. Сравнительная оценка физико-химических и иммунобиологических свойств вакцины чумной живой сухой, приготовленной с использованием различных питательных сред

Показатель качества, свойство	Требования НД [3]	Результаты исследований вакцины, приготовленной с использованием среды из ...	
		ФГБОКМ	КГК _д
Внешний вид	Пористая масса серовато-белого цвета	Пористая масса серовато-белого цвета	
Растворимость, мин	Через 3 мин гомогенная взвесь серовато-белого цвета без посторонних примесей и хлопьев	Через 3 мин гомогенная взвесь серовато-белого цвета без посторонних примесей и хлопьев	
Посторонняя микрофлора	Не допускается	Отсутствует	
Потеря в массе при высушивании, процент	4,0, не более	3,1	3,3
Термостабильность, сут	4, не менее	5,8	5,5
Общая концентрация микробных клеток, млрд м.кл. × см ⁻³	От 50 до 100	85	80
Концентрация живых микробных клеток, млрд ж.м.кл. × см ⁻³	-	29,3	26,4
Специфическая безвредность	Безвредна	Безвредна	
Иммуногенность, (ЕД ₅₀) ж.м.кл., для ...:			
белых мышей	40000, не более	28350	31780
морских свинок	10000, не менее	8258	8980

ной скорости роста и меньшую продолжительность одной генерации с большим числом генераций за цикл культивирования. Кроме того, экспериментальные культуры согласно характеристике фазового состояния (0,824) были наиболее близки к завершению процесса роста.

Исследования показали возможность использования ПС из ФГБОКМ для глубинного выращивания и накопления биомассы чумного микроба штамма EV.

Полученные в процессе глубинного культивирования микробные суспензии использовали на дальнейших этапах приготовления конечного продукта – вакцины чумной живой сухой.

Результаты сравнительной оценки физико – химических и иммунобиологических свойств вакцин, наработанных с использованием экспериментальной и контрольной ПС, представлены в таблице 3.

Литература:

1. Микробиологические питательные среды: Каталог ФГУП Научно – производственного объединения «Питательные среды». – Махачкала, 2001.
2. Равилов А.З., Гильмутдинов Р.Я., Хусанов М.Ш. Микробиологические среды. – Казань, Изд. «Фэн», 1999.
3. Телишевская А.Я. Белковые гидролизаты: получение, состав, применение. – М.: «Россельхозакадемия», 2000.
4. Промышленный регламент ПР 08461522-07-08 на производство вакцины чумной живой, лиофилизата для приготовления суспензии для инъекций, ингаляций и кожного скарификационного нанесения.
5. ГОСТ 17626-81. Казеин технический. Введ.: 31.07.1981 г.
6. Мурашов А.С. Молочная промышленность Приволжского федерального округа // Молочная промышленность. – 2001 № 4. – С. 8.
7. Некоторые направления стандартизации питательных сред из казеина. Зайцев В.Ф., Маслов С.А., Комоско Г.В., Лещенко А.А., Лазыкин А.Г., Филимонова Г.В.// Сборник научных трудов, посвященный 75-летию НИИ микробиологии МО РФ. Киров – 2003 С. 145.
8. Кобазев Н.И. Термодинамические факторы в кинетике размножения простых и сложных прототипов // Журн. физ. хим. - 1962 – Т. 36, вып.1. – С. 21 – 31.