

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ЭКСПЕРТИЗЫ СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ»

---

**РУКОВОДСТВО  
ПО ПРОВЕДЕНИЮ  
ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ  
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

*Часть первая*

Москва  
2012

## ГЛАВА 3

### МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОЦЕНКЕ ИММУНОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

*Составители: академик РАМН, проф. Р.М. Хаитов; к. б. н. А.С. Иванова;  
д. б. н. Л.П. Коваленко; член-корр. РАМН, проф. А.Д. Дурнев, д. м. н. А.Н. Миронов;  
д. м. н., проф. Е.В. Арзамасцев; к. б. н. Т.Б. Мастернак; к. б. н. О.Н. Стеценко;  
д. м. н., проф. Р.И. Атауллаханов; член-корр. РАМН, проф. Т.А. Гуськова*

#### Введение

В последние два десятилетия возрастающее количество публикаций о повреждающем действии на иммунную систему факторов загрязнения окружающей среды и ряда ЛП привело к формированию самостоятельного научного направления — иммунотоксикологии.

Иммунотоксикология зародилась во второй половине 70-х годов XX столетия. В 1979 г. в «Анналах Нью-Йоркской Академии наук» публикуются материалы первого симпозиума, посвященного данному вопросу, а в 1983 г. в журнале «Immunology Today» впервые было формально заявлено о возникновении нового научного направления — иммунотоксикологии — как результата слияния иммунологии и токсикологии [15, 17].

Иммунотоксикология в исследовательском плане определяется как наука, занимающаяся идентификацией и анализом внешнесредовых агентов, химических, пищевых и лекарственных факторов, которые вызывают изменения иммунитета [18].

Первое десятилетие существования иммунотоксикологии было ознаменовано развитием исследований по следующим направлениям [15, 22]:

- доказательство того, что иммунная система организма может являться мишенью поражающего действия ксенобиотиков;
- подтверждение того, что иммуносупрессия, гиперчувствительность и аутоиммунные процессы могут являться нежелательными последствиями воздействия ксенобиотиков;
- разработка стандартной группы тестов для изучения иммунотоксичности на грызунах.

К настоящему времени поле научных интересов в области иммунотоксикологии представляет собой четко ограниченную область иммунологии, основывающуюся на токсикологических принципах. Так как во всем мире в обществе растет понимание важности связи между иммунитетом и общим состоянием здоровья человека, значение иммунотоксикологии возрастает до степени жизненно важного междисциплинарного направления.

В настоящее время иммунотоксикология как научное направление полноправно присутствует в программах большинства токсикологических исследовательских учреждений.

В отличие от установленных Протоколов доклинического изучения общетоксического действия, методологические и методические проблемы исследования иммунотоксического действия фармакологических средств до настоящего времени остаются предметом поиска и дискуссий во всем мире.

В нашей стране был разработан ряд соответствующих методических рекомендаций, регламентирующих изучение влияния на иммунную систему фармакологических средств, изучение аллергизирующего и иммунотоксического действия потенциальных ЛП [2, 3, 7, 8, 11, 13].

Под иммунотоксическим действием традиционно понимают модифицирующее влияние ксенобиотиков и ЛС на иммуногенез, включая иммуносупрессию и гиперстимуляцию иммунитета, способное привести к снижению резистентности организма к инфекции, повышению риска онкологических заболеваний, развитию аутоиммунной патологии и аллергизации организма [28].

Основная задача доклинического изучения влияния потенциальных ЛС на иммунную систему состоит в том, чтобы в эксперименте на животных доказать или исключить возможность развития иммунотоксического действия, вызванного фармакологическим средством или его метаболитами.

Предложенный подход к оценке иммунотоксического действия фармакологических средств заключается в исследовании ряда интегральных иммунологических функций, позволяющих с учетом результатов гематологических и морфологических исследований лимфоидных органов оценить возможный риск при применении нового фармакологического средства.

### **Общие положения**

*Обязательному тестированию на иммунотоксичность* должны подвергаться новые, оригинальные фармакологические средства, а также известные ЛС, для которых отсутствуют данные об изучении иммунотоксичности, рекомендуемые:

- а) для применения длительными повторными курсами;
- б) применения в детской практике, а также для лечения беременных женщин и при назначении в период лактации;
- в) в качестве профилактических средств и контрацептивов;
- г) для использования без назначения врача среди широких слоев населения.

*Рассматривается индивидуально* вопрос об изучении иммунотоксичности препаратов:

- а) предназначенных для лечения злокачественных новообразований;
- б) однократно или коротким неповторяющимся курсом.

*Тестирование не обязательно* для препаратов, предлагаемых:

- а) для лечения заболеваний, представляющих непосредственную угрозу для жизни;
- б) для средств, безопасность применения которых была изучена в рамках исследования специфической активности;
- в) воспроизводимых отечественных и зарубежных ЛС, если в литературе имеются достаточно обоснованные сведения экспериментального и ретроспективного характера, подтверждающие отсутствие иммунотоксических свойств соответствующего аналога.

Методические рекомендации предназначены для сотрудников исследовательских лабораторий, занимающихся доклиническими исследованиями потенциальных ЛС.

Настоящие Методические рекомендации являются частью общей программы доклинического изучения безопасности новых ЛС и направлены на оценку потенциального риска для иммунной системы человека.

## **2. Методология иммунотоксического тестирования**

Главной задачей иммунотоксикологии является разработка стратегии оценки состояния иммунитета, которая позволит четко прогнозировать последствия влияния экзогенных факторов на иммунную систему человека.

Наиболее подробно и тщательно вопросы методологии иммунотоксикологического исследования были рассмотрены в 1994 г. на рабочем совещании, состоявшемся в Арлингтоне (США) [25]. При тестировании на иммунотоксичность предлагается использовать этапный подход, как правило, двух- или трехуровневый. При оценке иммунотоксичности приоритет отдается функциональным методам иммунологического исследования, морфологические и гистологические исследования служат дополнением. На совещании большое внимание уделялось стандартизации методов: валидность

метода (селективность, специфичность, чувствительность, точность и воспроизводимость); выбор животных (видовые и генетические особенности); межлабораторная верификация исследований.

Существующие представления о ходе развития защитных реакций иммунной системы [12] свидетельствуют о том, что в эксперименте обнаружить повреждения в иммунной системе под воздействием химических или фармакологических средств с большей вероятностью можно при использовании модели антигенного стимула, т. е. на фоне развития специфического иммунного ответа, включающего в себя все этапы иммунного реагирования.

При обсуждении условий проведения исследований иммуотоксических свойств фармакологических средств наибольшие дискуссии вызывают вопросы выбора методов, доз и схем введения исследуемого препарата.

Накопленный 20-летний опыт изучения иммуномодулирующего и иммуотоксического действия фармакологических средств определяет использование комплексного подхода. Этот подход включает в себя изучение действия исследуемого соединения как при однократном введении в широком диапазоне доз, различающихся на 3–4 порядка, так и при курсовом введении в дозах, отобранных при однократном введении с учетом дозы, рекомендуемой для клинического изучения и ЛД<sub>50</sub> препарата.

Однократное введение фармакологического средства с перерывом в 1 ч от введения антигена позволяет выявить прямое действие на иммунные реакции и на клетки иммунной системы. Курсовое введение позволяет оценить и не прямое иммуотоксическое действие, связанное с нарушением органов и систем организма, сопряженных с иммунной системой (нервная и эндокринная системы, печень и др.).

Для предварительного анализа иммуотоксичности фармакологического средства могут быть использованы:

— данные литературы о влиянии на иммунную систему аналогов или близких по действию и химической структуре веществ;

— результаты изучения общетоксического действия, полученные при изучении подострой и хронической токсичности. Окраска органов иммуногенеза азуром 2 и эозином вместо традиционно используемого в токсикологии гематоксилина позволяет оценить зональную принадлежность и степень дифференцировки иммунокомпетентных клеток. Оценку активности морфологических изменений в лимфоидных органах можно проводить с использованием метода рангов (приложение 2).

### **3. Условия проведения эксперимента**

#### ***3.1. Предварительная оценка иммуотоксичности при однократном введении***

Цель данного этапа — выявить возможный иммуотропный потенциал фармакологического средства при однократном введении животным в широком диапазоне доз. Независимо от предполагаемых доз и пути введения препарата в клинической практике оценку иммуотропного потенциала предлагается проводить по схеме, оптимальной для выявления как иммуносупрессивного, так и иммуностимулирующего действия. Оценка проводится в интегральном функциональном тесте: выработка антителообразующих клеток (АОК) при иммунизации мышей Т-зависимым антигеном — эритроцитами барана (ЭБ). Результаты этих исследований позволяют выявить характер действия на иммунную систему и активную дозу фармакологического средства. Эти данные используются для обоснования последующих исследований.

Препарат вводится однократно, внутривенно или внутривентально (экспериментальный аналог внутривенного введения).

Уровень доз — 10-кратная терапевтическая для человека в расчете на единицу массы тела и в дозах, кратных 5 (50-кратная, 250-кратная, 1250-кратная). В случае невозможности использования высшей из предложенных доз используется 1/10–1/20 ЛД<sub>50</sub>.

Препарат вводится в день иммунизации животных (перерыв 1 ч) эритроцитами барана в дозе  $2 \times 10^7$ .

Оценку реакции производят на 4-е сутки методом локального гемолиза в геле агарозы (приложение 1).

Мыши-гибриды (СВА  $\times$  С57BL/6)F, 6–8-недельного возраста массой 18–20 г.

### **3.2. Оценка иммунотоксичности при курсовом введении**

Целью данного этапа является оценка степени и длительности возможного повреждения иммунной системы при введении препарата по схеме, максимально приближенной к клиническому применению.

*Режим введения* — индивидуально, согласно предполагаемому для использования в клинике.

*Способ введения* — согласно предполагаемому в клинике (для внутривенных препаратов можно рекомендовать внутрибрюшинное введение животным).

*Уровень доз* — как минимум два: 10-кратная терапевтическая и доза на порядок выше нее. В случае невозможности использования высшей из указанных доз, максимальная доза обосновывается индивидуально исходя из специфики препарата.

*Сроки наблюдения:* оценку состояния иммунной системы проводят по окончании введения фармакологического средства и в случае выявления изменений какого-либо параметра через 7–21 день с целью определения срока восстановления нарушенной функции.

### **3.3. Экспериментальные животные**

Используются сертифицированные животные: мыши СВА, Balb c, С57BL/6 и др. с массой тела 18–20 г. Однако в иммунотоксикологических экспериментах предпочтительно использование гибридов первого поколения 6–8-недельного возраста (масса тела 20–22 г). Такой выбор животных обоснован фенотипической стабильностью и большей жизнеспособностью, связанной с их гетерозиготностью. Кроме того, это позволяет снизить вероятность непредсказуемого влияния нового вещества на величину реакции в случае использования высоко- или низкоотвечающих мышей инбредных линий. Наиболее доступными в наших условиях являются мыши-гибриды (СВА  $\times$  С57BL/6)F1, и (С57BL/6  $\times$  DBA)F1.

Группы формируются с учетом получения статистически достоверных результатов (не менее 10 голов). Разброс в группе по массе тела не должен превышать  $\pm 10\%$ . Необходимо, чтобы контрольные и получавшие препарат животные были одного пола, возраста, получены одновременно из одного питомника, содержались в аналогичных условиях. Условия содержания и питания животных должны соответствовать установленным правилам.

В связи с тем, что действие фармакологического препарата зависит от физиологического состояния животных, изменяющегося под влиянием ряда внешних факторов, рекомендуется все исследования проводить в одно и то же время суток (предпочтительно утром).

*Контроль:* контрольной группе животных вводится соответствующий растворитель в том же объеме и по той же схеме, что и наследуемый препарат. При длительном введении препарата желательно предусмотреть группу интактных животных (того же возраста и источника) для выявления возможных изменений в иммунной реактивности, обусловленных факторами, не имеющими отношения к исследуемому веществу (стресс и др.). Желательно в качестве положительного контроля предусмотреть также использование известных иммуноотропных препаратов иммуностимулирующего и иммуносупрессирующего действия.

### **3.4. Обоснование предлагаемых методов и подходов к оценке иммунотоксичности на первом этапе исследования**

Luster и соавт. в руководстве «Methods in Immunotoxicology» [23] приводят доказательства высокой прогностической ценности использования комплекса перечисленных методов для оценки риска при изучении иммунотоксического действия.

Используется один из предложенных или другие адекватные поставленным задачам методы.

Из приведенных выше методов тестирования иммунотоксичности наибольшего внимания с точки зрения информативности заслуживает оценка гуморального иммунного ответа, т. е. способность иммунной системы к выработке антител в ответ на инфекционные и неинфекционные антигены. Процесс антителообразования, в котором в кооперативном взаимодействии участвуют все основные клетки иммунной системы (Т-, В-, А-), включает главные этапы иммунного реагирования (фагоцитоз, презентацию антигена, распознавание, активацию, пролиферацию, созревание, синтез специфических антител и т. п.), а также сопровождается каскадом цитокиновых реакций.

Таблица 1

*Программа первого этапа оценки иммунотоксического действия фармакологических средств при курсовом введении*

Оцениваемая функция	Модельные реакции	Иммунологические тесты
Гуморальный иммунный ответ	Оценка антителообразования у животных при иммунизации их тест-антигенами	1. Определение антителообразующих клеток к ЭБ в реакции локального гемолиза в геле агарозы (метод Ерне). 2. Реакции гемагглютинации и гемолиза
Клеточный иммунный ответ	Индукция реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) к корпускулярному антигену и/или гаптену	Реакция ГЗТ к ЭБ или гаптену – тринитробензолсульфоновой кислоте (ТНБС)
Активность фагоцитов	Оценка фагоцитарной и бактерицидной активности фагоцитирующих клеток разной локализации	1. Фагоцитоз агентов различной природы (ЭБ, тушь, латекс, стафилококк и др.) перитонеальными макрофагами. 2. Хемилюминесценция клеток при фагоцитозе опсонизированного материала. Определение активности фермента 5'-нуклеотидазы

В качестве антигена могут быть использованы эритроциты барана (ЭБ). Этот экспериментальный Т-зависимый тест-антиген наиболее полно моделирует различные варианты чужеродного агента (корпускулярный, тимус-зависимый, содержащий множество антигенных детерминант).

Наибольшее число исследователей в нашей стране и за рубежом для оценки гуморального иммунного ответа отдают предпочтение методу определения числа антителообразующих клеток (АОК) в селезенке мышей при иммунизации Т-зависимым антигеном [3, 8, 13, 20, 21]. Именно этот интегральный показатель широко используется многими исследователями на первом этапе тестирования фармакологических средств. Оценка иммуотропного потенциала исследуемого препарата проводится в схеме, оптимальной для выявления как иммуносупрессивного, так и иммуностимулирующего действия (приложение 1).

Анализ результатов собственных исследований и данных литературы позволил выявить высокую степень корреляции между активацией антителообразования и системы фагоцитов и влиянием на резистентность организма к инфекции [5].

**Оценку клеточного иммунитета** традиционно проводят с использованием реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) при введении определенных

классов антигенов (эритроциты барана, туберкулин, овалбумин и др.). Наиболее информативным представляется использование для сенсибилизации тринитробензолсульфоновой кислоты (ТНБС). Механизм индукции гиперчувствительности замедленного типа при введении этого гаптена подобен таковому при развитии контактной аллергии ко многим химическим и лекарственным веществам, образующим комплексы с белками организма. Усиление выраженности данной реакции под влиянием фармакологического средства может характеризовать также и риск изменения аллергостатуса и возможность повышения чувствительности организма к традиционным аллергенам.

Следующим, обязательным тестом первого этапа исследования иммунотоксичности является оценка фагоцитарной и бактерицидной активности фагоцитов различной локализации: периферической крови, фагоцитирующих клеток перитонеального экссудата. При этом в качестве антигена используются агенты различной природы: тушь, эритроциты барана, латекс, стафилококк и т.п. В настоящее время во многих лабораториях для оценки активности фагоцитов широко используется метод хемилюминесценции клеток при фагоцитозе опсонизированного материала *in vitro*. Доказана также высокая информативность в оценке функциональной активности макрофагов метода определения уровня мембранного фермента 5'-нуклеотидазы [10]. Установлено, что активность препаратов, выявленная в указанном тесте, коррелирует с иммуноадьювантной активностью и способностью изменять резистентность животных к инфекции [5].

Важно, что при мозговой травме различного генеза лейкоциты генерируют токсичные продукты окисления, способствующие совместно с провоспалительными цитокинами адгезии лейкоцитов к эндотелию сосудов и прохождению через него в паренхиму мозга, вызывая периваскулярный отек и увеличивая зону поражения на 25–45% [24, 27, 29]. Следовательно, стимуляция нейтрофильных гранулоцитов под действием препаратов некоторых фармакологических групп, например кардиотропных и нейропротективных средств, нельзя расценивать как однозначно позитивный эффект.

При выявлении на первом этапе нарушений в иммунном ответе под влиянием фармакологического средства приступают к исследованиям второго этапа, целью которого является получение дополнительной информации о механизме действия исследуемого вещества, что позволяет в большей степени вероятности прогнозировать последствия применения в клинике фармакологического средства.

### **3.5. Обоснование предлагаемых методов и подходов к оценке иммунотоксичности на втором этапе исследования**

При выявлении на первом этапе исследований чрезмерной активации отдельных звеньев иммунитета имеется по крайней мере два аспекта для прогноза опасности при применении потенциального ЛС, а именно: возможное усиление аллергизации и развитие аутоиммунной патологии.

Требования к оценке аллергизирующих свойств фармакологических средств изложены в специальных методических указаниях [4].

Оценка аутоенсибилизации является сложной задачей вследствие разнообразия и специфичности структур организма, которые могут явиться мишенью конкретной аутоагрессии.

В рамках данных рекомендаций для получения первичной информации о возможности срыва толерантности применяют методы, широко используемые в иммунологических исследованиях.

Для изучения митогенных свойств фармакологического средства и влияния его на пролиферацию лимфоцитов рекомендуется реакция бласттрансформации лимфоцитов.

При наличии водорастворимой формы исследуемого средства реакция лимфоцитов на повторный контакт с ним *in vitro* позволяет оценить возможность сенсибилизации

организма животных, а добавление препарата в культуру пролиферирующих клеток интактных животных позволяет оценить его прямой митогенный эффект. Достаточно информативным, коррелирующим с сенсибилизирующими свойствами фармакологического средства является факт усиления ФГА-индуцированной пролиферации спленоцитов мышей после введения им препарата [6].

В качестве альтернативного метода оценки потенциальной способности фармакологических средств индуцировать аутоиммунные и аллергические реакции широко используется методика определения массы и клеточности подколенного лимфатического узла, так называемый *popliteal lymph node assay*, PLNA [16]. В журнале «Toxicology» [26] данный тест рекомендуется для прогноза лекарственной аллергии и аутоиммунитета: тестирование 130 соединений с помощью PLNA показало положительную корреляцию с документированным аутоиммунным и аллергическим потенциалом и отсутствие ложноотрицательных результатов.

Таблица 2

Программа второго этапа оценки иммунотоксического действия фармакологических средств при курсовом введении

Оцениваемая функция	Модельная система	Иммунологические тесты
Митогенные свойства	Прямое митогенное действие лекарственных препаратов на лимфоциты	Реакция бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) под влиянием исследуемого препарата <i>in vitro</i>
Поликлональные свойства	Поликлональная активация различных клонов антителообразующих клеток	Определение антителообразующих клеток к различным антигенам в реакции локального гемолиза (ЭБ, ЭБ-ТНВС, ЭК)
Функциональная активность лимфоцитов	Пролиферативная активность лимфоцитов <i>in vitro</i>	Реакция бласттрансформации лимфоцитов (спонтанная и индуцированная Т- и В-митогенами)
Резистентность мышей к экспериментальной инфекции	Заражение животных различными видами микроорганизмов	Учет выживаемости и продолжительности жизни

Кроме указанных иммунологических методов исследования, важную дополнительную информацию о возможном развитии аутоиммунных осложнений могут дать морфологические исследования потенциальных органов — мишеней аутоагрессии (почки, щитовидная железа, миокард и др.).

На втором этапе для уточнения последствий изменений в гуморальном и/или клеточном иммунитете предлагается использовать прямой метод заражения животных патогенными вирусами и бактериями после окончания введения препарата и 2–3 недели спустя. Оценка выживаемости и продолжительности жизни в сравнении с контрольными животными дает прямой ответ на вопрос: приводит ли к развитию вторичного иммунодефицита и срыву антиинфекционного иммунитета вызванное фармакологическим средством нарушение и как быстро восстанавливается иммунная система. Указанные исследования могут проводиться только в специализированной лаборатории.

#### 4. Интерпретация результатов

Интерпретация результатов экспериментальных исследований, адекватная клиническим ситуациям, экстраполяция полученных данных на человека представляет наибольшую сложность в иммунологии, следовательно, и в рассматриваемой проблеме.

Известно, что иммунная система способна к быстрому реагированию на изменение гомеостаза и в то же время обладает значительными резервами к самовосстановлению. Существуют механизмы обратного развития иммунного ответа, направленные на восстановление структуры иммунной системы до состояния, близкого к исходному. Важную роль играет при этом прекращение вовлечения в реакцию новых клонов клеток в связи с устранением антигенного стимула. Срабатывает также ряд механизмов активной иммуносупрессии, которую обеспечивают Т-клетки и макрофаги. В данном случае роль указанных клеток состоит в генерации неспецифических супрессорных сигналов, направленных на ограничение и прекращение иммунного ответа.

Временной интервал, в течение которого восстанавливаются нарушенные функции, следует рассматривать как очень важный показатель для характеристики безопасности препарата.

В случае выявления достоверных изменений какого-либо из исследуемых параметров иммунореактивности животных окончательный прогноз о возможном иммунотоксическом действии фармакологического средства можно будет сделать только после решения вопроса о длительности сохранения выявленного нарушения иммунологической функции и способности организма животных к восстановлению.

Для этого через 7–21 день по окончании курса введения исследуемого препарата проводится тестирование состояния иммунной системы по тем параметрам, для которых были выявлены достоверные изменения. Почему последний срок 21 день? Это срок, в течение которого созревает новая популяция лимфоцитов. Если через 3 недели у животных не произошло восстановления нарушенной функции, то исследуемый препарат следует отнести к высокоиммунотоксичным соединениям, он не может быть рекомендован для КИ.

В случае, когда измененная функция восстанавливается через 7–14 дней, можно полагать, что исследуемый препарат не вызывает серьезного повреждения иммунной системы животных. В то же время имеются основания прогнозировать вероятность риска нарушений иммуногенеза при использовании данного препарата у человека, иммунная система которого, как известно, отличается более высокой чувствительностью по сравнению с животными, особенно мышами. Решение о целесообразности дополнительного иммунотоксикологического исследования конкретного фармакологического средства и рекомендация его КИ должно приниматься индивидуально в зависимости от его уникальности. Если это уникальное фармакологическое средство, не имеющее аналогов, и будет принято решение о его КИ, то необходимо предусмотреть контроль иммунного статуса на первом и втором этапе фазы КИ и методы коррекции в случае выявления иммунопатологического эффекта.

### **Заключение**

Проводимые по обсуждаемой Программе экспериментальные исследования фармакологических средств могут помочь установить противопоказания или ограничения при применении потенциального ЛС или, напротив, выявить возможность расширения сферы его применения как иммуномодулятора. В последнем случае изучение специфической иммуномодулирующей активности фармакологических средств должно явиться предметом специальных исследований, выходящих за рамки изучения безопасности ЛП. Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздрава России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

### *Приложение 1*

Опыт работы позволяет авторам предложить следующие варианты постановки вышеуказанных методов.

### **Определение массы и клеточности органов иммунной системы**

Мышей подвергают эвтаназии с помощью цервикальной дислокации, извлекают тимус, селезенку, лимфатические узлы и трубчатые кости. Лимфоидные органы взвешивают и с помощью стеклянного гомогенизатора готовят клеточную взвесь на среде 199 или на растворе Хенкса (рН 7,4). Полученную суспензию фильтруют через 2 слоя капрона и дважды отмывают путем центрифугирования при 200g в течение 5 мин. Средой 199 из костей вытесняют и затем гомогенизируют костный мозг. Далее подсчитывают концентрацию ЯСК в органе и в относительных значениях по отношению к массе органа.

### **Определение числа антителообразующих клеток (АОК)**

Метод основан на образовании вокруг клеток, продуцирующих антитела с высокой гемолитической активностью (Ig M-антитела), сферической зоны лизиса после добавления антигена и комплемента. Существует значительное число модификаций метода Эрне и Нордина, поэтому исполнители могут выбрать вариант, оптимально отвечающий задаче конкретного исследования.

Мышам вводят внутрибрюшинно суспензию трижды отмытых в стерильном изотоническом растворе натрия хлорида эритроцитов барана (ЭБ) в субоптимальной дозе, равной  $5 \times 10^7$  ЭБ/мышь. Рекомендуются, чтобы пути введения антигена и тестируемого препарата различались. Поэтому препарат согласно предполагаемому способу клинического использования вводят иным путем в 2 дозах по схемам, указанным выше. На 5-е сутки после иммунизации определяют число АОК в селезенке. Целесообразно также проведение реакции локального гемолиза на предмет обнаружения возможного влияния на бляшкообразование (в эксперимент добавляют 3 группы без введения ЭБ: две с введением препарата и одна — интактные животные). Наличие эффекта поликлональной активации будет свидетельствовать о риске развития аутоиммунного состояния.

*Постановка реакции.* Животных подвергают эвтаназии с помощью цервикальной дислокации, извлекают селезенки и готовят клеточную суспензию при помощи стеклянного гомогенизатора. Суспендирование проводят в растворе Хенкса (рН 7,2–7,4) в объеме 5 мл на холоде. Приготовленную суспензию фильтруют через 1 слой капрона и помещают в холодильник.

Приготовление агарозной смеси. Расплавленную в дистиллированной воде 2 % агарозу (пригодна агароза различных фирм) добавляют к равному объему нагретого до 45–48 °С двукратного (10-кратной концентрат, разведенный в 5 раз дистиллированной водой) раствора Хенкса. В приготовленную таким образом агарозу вносят суспензию ЭБ (концентрация 6–8 млрд/мл) из расчета 1,2 % ЭБ на окончательный объем агарозы. По 2,75 мл полученной смеси разливают по пробиркам, предварительно помещенным в водяную баню с температурой 46–48 °С. Далее в пробирки, содержащие агарозу с ЭБ, вносят определенное количество суспензии селезеночных клеток (как правило, 0,05–0,2 мл), желательно определить его в предварительных исследованиях. Содержимое пробирок встряхивают и выливают на чашки Петри (диаметр чашки 100 мм). Осторожным покачиванием и вращением смесь равномерно распределяют по дну чашки. После застывания агарозы чашки помещают в термостат при 37,5 °С на 1 ч. Затем на поверхность агарозы в чашках наливают по 3 мл раствора сухого комплемента морской свинки (разведение в изотоническом растворе натрия хлорида 1:5) и вновь инкубируют в термостате при 37 °С в течение 45 мин. После инкубации комплемент сливают и проводят подсчет образовавшихся бляшек (зон гемолиза). При относительно небольшом числе бляшек (примерно до 120 на чашку) их подсчитывают полностью. Если же бляшек больше, то их подсчет производят следующим образом. В листе плотной черной бумаги вырезают отверстие в форме квадрата со стороной 1 см (т.е. площадью 1 см<sup>2</sup>). Подкладывая лист с вырезанным квадратом под доньшко чашки, подсчитывают выборочно число бляшек в 10 таких квадратах в разных участках чашки с последующим перерасчетом на всю поверхность агарозы в чашке (коэффициент перерасчета для чашек диаметром

100 мм равен 6,88). Зная объем клеточной суспензии, вычисляют количество бляшек (АОК) на всю селезенку.

При статистической обработке полученных данных определяют среднюю геометрическую числа АОК и стандартную ошибку. При сравнении результатов применяют критерий  $t$  Стьюдента. Достоверными считают различия при  $P < 0,05$ . При постановке экспериментов необходимо использовать не менее 10 животных в группе. Итоговые результаты являются суммарными показателями, по крайней мере, 2 исследований.

Реакцию Эрне можно заменить определением на 7-е сутки после иммунизации титра антител в сыворотке крови мышей с помощью реакции гемагглютинации.

### **Оценка фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов**

Для фагоцитоза можно использовать различные частицы (меченые эритроциты, дрожжевые тельца, частицы латекса и др.). Здесь приводится описание фагоцитоза частиц коллоидной туши. По окончании введения мышам исследуемого препарата через 24 ч оценивают у них фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов по интенсивности захвата ими частиц туши, введенной животным внутрибрюшинно в виде 0,05 % суспензии в объеме 2 мл. Через 10 мин брюшную полость промывают 5 мл изотонического раствора натрия хлорида. Подсчитывают таким образом клетки перитонеального экссудата (КПЭ) отмывают, ресуспендируют в 1–2 мл изотонического раствора натрия хлорида, подсчитывают концентрацию ЯСК и процент фагоцитирующих клеток. Далее клетки осаждают центрифугированием, супернатант удаляют, а осадок КПЭ лизируют дистиллированной водой. Лизаты КПЭ затем помещают в плоскодонные планшеты и определяют с помощью спектрофотометра «Multiscan MCC 340» при длине волны, равной 620 нм, оптическую плотность, отражающую количество туши, поглощенной перитонеальными фагоцитами. Результаты выражают в условных единицах, отражающих оптическую плотность лизата КПЭ, соотношенную с количеством фагоцитирующих клеток.

*Исследования позволяют оценить:*

- концентрацию и количество ядросодержащих клеток в ПЭ;
- процент и количество фагоцитирующих клеток в ПЭ;
- суммарное количество туши, поглощенной КПЭ;
- количество туши, поглощенной одним фагоцитом (фагоцитарный индекс).

### **Определение активности нейтрофилов в тесте хемилюминесценции**

В качестве источника нейтрофилов используют гепаринизированную кровь мышей гибридов F1 (СВА´С57В1/6), выделенную путем декапитации животных. С целью выделения фракции нейтрофилов полученную кровь наслаивают на двойной градиент (гистопак 1,077 г/см<sup>3</sup> и гистопак 1,119 г/см<sup>3</sup>, Sigma Chemical Co.) и центрифугируют в течение 30 мин при 1500 об/мин [18]. После центрифугирования лейкоциты собирают с границы раздела фаз и трижды отмывают раствором Хенкса (рН=7.4). Жизнеспособность клеток оценивают в тесте с трипановым синим. Используют только те образцы, жизнеспособность клеток в которых составляет не менее 95 %. Подсчет клеток производится в счетной камере Горяева под микроскопом Standart-20. На протяжении работы клетки сохраняют при температуре тающего льда.

Для стимуляции хемилюминесценции используется опсонизированный зимозан (рецептор-опосредованный стимулятор, Sigma Chemical Co.). Хемилюминесценцию регистрируют на хемилюминесценциметре Bioorbit 1251 (Швеция), при постоянном перемешивании и температуре 37 °С. Среда измерения включает: 130 мМ NaCl, 5 мМ глюкозы, 5 мМ KCl, 1,5 мМ MgSO<sub>4</sub>, 0,5 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4 мМ NaHCO<sub>3</sub>, 1 мМ CaCl<sub>2</sub>, 0,65 мМ люминола (рН=7.4). Общий объем кюветы для измерения составляет 1 мл. В кювету прибора помещают люминольную среду и клеточную взвесь, так чтобы количество нейтрофилов было одинаковым во всех пробах (конечная концентрация нейтрофилов составляет 5×10<sup>5</sup> – 8×10<sup>5</sup> клеток/мл). Спонтанный уровень хемилюминесценции измеряют в течение 1 мин, затем к содержимому

кюветы добавляют 10 мкл опсонизированного мышшиной сывороткой зимозана в концентрации 10 мг/мл. После чего регистрируют уровень и кинетику хемилюминесценции в течение 20 мин. Интенсивность хемилюминесцентного ответа оценивают по максимальному значению на кинетической кривой. Среднее значение интенсивности хемилюминесценции определяют по данным не менее чем трех идентичных измерений.

### **Оценка влияния препаратов на гиперчувствительность замедленного типа**

О состоянии клеточного иммунитета животных после введения им фармакологических препаратов можно судить по способности мышшей к индукции реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) к эритроцитам барана (ЭБ) и к тринитробензолсульфоновой кислоте (ТНБС). Использование двух разных антигенов позволяет с большей вероятностью выявить стимулирующий или ингибирующий эффект препаратов, так как эти реакции различаются по своей интенсивности (очень высокая в случае ТНБС). При использовании только одного антигена предпочтение следует отдать ТНБС в силу высказанных выше причин.

По окончании курса введения препарата мышшей-самцов (СВА × С57ВL/6)F1 иммунизируют подкожно эритроцитами барана ( $2 \times 10^8$ ) в межлопаточную область или 10 мМ раствором ТНБС (0,2 мл) в основание хвоста. Вторую (разрешающую) инъекцию антигена производят на 5-е сутки в подушечку задней лапы — «исследуемая лапа» (50 мкл суспензии ЭБ, содержащей  $10^8$  клеток) или на 6-е сутки (50 мкл 10 мМ раствора ТНБС). В контролатеральную лапу вводят 50 мкл стерильного изотонического раствора натрия хлорида («контрольная лапа»). Результаты реакции регистрируют через 24 ч путем определения массы «исследуемой» и «контрольной» лап. Индекс реакции для каждого животного определяют по формуле:

$$I_p = \frac{M_{on} - M_k}{M_k} \times 100\%;$$

где  $M_{on}$  и  $M_k$  — масса «исследуемой» и «контрольной» лап.

При статистической обработке определяют среднюю арифметическую и стандартную ошибку показателей. Достоверность различий — по  $t$ -критерию Стьюдента.

### **Исследование спонтанной и индуцированной митогенами пролиферации спленоцитов**

Иммуностропные, митогенные, а в ряде случаев и аллергенные свойства исследуемых препаратов можно оценить с помощью реакции бласттрансформации лимфоцитов. Использование этого подхода с применением Т- и В-клеточных митогенов позволяет также оценить преимущественное влияние фармпрепаратов на Т- или В-клеточные популяции лимфоцитов.

*Постановка реакции.* Животных получавших препарат и контрольных групп подвергают эвтаназии с помощью цервикальной дислокации, извлекают селезенки и готовят клеточную суспензию при помощи стеклянного гомогенизатора. Полученные спленоциты отмывают средой 199 с 5% сыворотки крупного рогатого скота и по 200 мкл клеточной взвеси (с концентрацией  $2 \times 10^6$  мл) в среде RPMI-1640 (Flow, Англия), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, Англия), 10 мМ Нерес (Gibco, Англия), 2 мМ L-глутамина (Sigma, США), 10 мМ 2-меркаптоэтанол (Sigma, США), 100 мг/мл стрептомицина и 100 ед/мл пенициллина вносят в лунки 96-луночных планшетов. В часть лунок одновременно вносят митогены (ФГА, ЛПС) в предварительно оттестированных концентрациях (10–20 мкг/мл). Контрольные лунки митогена не содержат. При наличии инъекционной или растворимой формы исследуемого препарата проводят оценку их митогенных свойств, помещая в различных концентрациях в лунки, содержащие спленоциты интактных животных. Внесение же препаратов в максимальной не митогенной концентрации в культуру спленоцитов животных, получавших препарат, позволяет судить о возможности сенсibilизации организ-

ма животных к препарату в случае повышения пролиферации при повторном контакте с препаратом спленоцитов животных получавших препарат групп.

Затем селезеночные клетки инкубируют в течение 96 ч в атмосфере  $\text{CO}_2$  при температуре 37 °С и за 24 ч до окончания культивирования в лунки добавляют по 1 мкКи раствора  $^3\text{H}$ -тимидина в объеме 10 мкл. Интенсивность включения  $^3\text{H}$ -тимидина (число импульсов/мин) определяют в клетках, собранных с помощью Cell Harvester (Flow), на сцинтилляционном счетчике (Marck-III).

Уровень РБТЛ спленоцитов под влиянием митогенов или вносимых в среду культивирования препаратов оценивали по отношению к интенсивности РБТЛ спленоцитов в среде, не содержащей митогены или используемые препараты. Для оценки влияния препаратов на РБТЛ сравнивали величину включения  $^3\text{H}$ -тимидина клетками селезенки мышей, получивших препараты, с таковой спленоцитов мышей, получивших изотонический раствор натрия хлорида. Результаты выражают в значениях импульсов в минуту.

### Патоморфологические исследования

1. Иммунокомпетентные органы — тимус, селезенку, лимфатические узлы различной локализации, фрагменты тонкого кишечника, включающие групповые лимфатические фолликулы (пейеровы бляшки) — рекомендуется фиксировать в жидкости Буэна в течение 24 ч [9].

Обезвоживание и проводку образцов, заливку в парафин с воском проводят по общепринятой в гистологии технике.

2. После депарафинирования срезы (толщиной 3–5 мкм) окрашивают азуром и эозином по Нохт–Максимову [9].

Результат окраски: цитоплазма клеток, в которых идет активный синтез РНК, имеет различные оттенки синего цвета, отчетливо дифференцируются все клетки, входящие в структуру изучаемого органа на момент эвтанази.

Для более объективной оценки влияния испытуемого препарата на структуру органов иммунной системы можно применить простой в исполнении полуколичественный метод рангов, предложенный экспертами ВОЗ для патоморфологических исследований в прозектурах [14].

Минимальное количество рангов от 0 до +++, где 0 обозначает отсутствие изменений, + — слабые изменения изучаемого признака (например, количество иммунобластов в коре тимуса или в паракортикальной зоне лимфатического узла), ++ — умеренные изменения и +++ — сильные изменения. Можно увеличить количество рангов от 0 до ++++++, где + и ++ обозначают минимальные изменения и т. п. Каждый ранг можно представить цифрой (например, + = 1, +++ = 3 и т.п.) и полученные результаты обрабатывать статистически с помощью непараметрического критерия U Вилкоксона–Манна–Уитни [1].

### Приложение 2

Название учреждения-исполнителя \_\_\_\_\_  
Подразделение \_\_\_\_\_  
Адрес \_\_\_\_\_  
Телефон \_\_\_\_\_  
Факс \_\_\_\_\_  
Ответственный исполнитель \_\_\_\_\_

### Протокол №

### Оценка влияния препарата на гуморальный иммунный ответ

Цель исследования \_\_\_\_\_  
Исследуемый препарат \_\_\_\_\_ Серия \_\_\_\_\_ Дата выпуска \_\_\_\_\_  
Схема введения \_\_\_\_\_

Начало введения \_\_\_\_\_ Окончание введения \_\_\_\_\_  
 Доза \_\_\_\_\_ мг/кг; \_\_\_\_\_ Способ введения \_\_\_\_\_  
 Концентрация \_\_\_\_\_ Объем введения \_\_\_\_\_ Время введения \_\_\_\_\_  
 Препарат сравнения \_\_\_\_\_ доза \_\_\_\_\_ мг/кг \_\_\_\_\_ на мышь

**Используемые животные:**

Мыши: линия \_\_\_\_\_ гибриды \_\_\_\_\_ пол \_\_\_\_\_ масса ( $M \pm m$ ) \_\_\_\_\_

Получены из питомника \_\_\_\_\_

Дата получения \_\_\_\_\_

Дата выхода из карантина \_\_\_\_\_

Количество животных в группе \_\_\_\_\_

**Метод оценки. Локальный гемолиз в геле агарозы** \_\_\_\_\_

**Оцениваемый параметр** – количество антителообразующих клеток (АОК) в селезенках мышей при иммунизации их эритроцитами барана \_\_\_\_\_

Дата иммунизации \_\_\_\_\_

**Антиген-эритроциты барана:**

Источник получения \_\_\_\_\_ Дата получения \_\_\_\_\_

Способ введения \_\_\_\_\_ Концентрация \_\_\_\_\_

Объем введения \_\_\_\_\_ Доза \_\_\_\_\_ Время введения \_\_\_\_\_

**Постановка реакции:**

Дата \_\_\_\_\_

**Источник антителообразующих клеток (АОК)**

Селезенка: Объем суспензии \_\_\_\_\_ Концентрация \_\_\_\_\_

Объем суспензии для внесения в смесь агарозы с ЭБ \_\_\_\_\_

**Комплемент** источник \_\_\_\_\_ разведение \_\_\_\_\_ объем внесения \_\_\_\_\_

*Результаты анализа. Индекс стимуляции АОК на селезенку*

№	Группы	Дозы	АОК/сел ( $M \pm m$ )	Индекс модуляции ( $M \pm m$ )	<i>p</i>	АОК/млн ЯСК ( $M \pm m$ )	Индекс модуляции ( $M \pm m$ )	<i>p</i>
1	Положит. контроль	–						
2	Отрицат. контроль	–						
3	Препарат	1 доза						
4	–«–	–«–						
5	–«–	–«–						
6	–«–	–«–						
7	–«–	–«–						
8	–«–	–«–						
9	–«–	–«–						
10	Препарат сравнения	–«–						

**Заключение**

Ответственный исполнитель \_\_\_\_\_

Должность \_\_\_\_\_

Дата \_\_\_\_\_ Подпись \_\_\_\_\_

Название учреждения-исполнителя \_\_\_\_\_

Подразделение \_\_\_\_\_

Адрес \_\_\_\_\_

Телефон \_\_\_\_\_

Факс \_\_\_\_\_

Протокол № \_\_\_\_\_

Оценка влияния препарата на клеточный иммунный ответ

Цель исследования \_\_\_\_\_  
 Исследуемый препарат \_\_\_\_\_ Серия \_\_\_\_\_ Дата выпуска \_\_\_\_\_  
 Схема введения \_\_\_\_\_  
 Начало введения \_\_\_\_\_ Окончание введения \_\_\_\_\_  
 Доза \_\_\_\_\_ мг/кг \_\_\_\_\_ Способ введения \_\_\_\_\_  
 Концентрация \_\_\_\_\_ Объем введения \_\_\_\_\_ Время введения \_\_\_\_\_  
 Препарат сравнения \_\_\_\_\_ доза \_\_\_\_\_ мг/кг \_\_\_\_\_ на мышь

**Используемые животные:**

Мыши: линия \_\_\_\_\_ гибриды \_\_\_\_\_ пол \_\_\_\_\_ масса ( $M \pm m$ ) \_\_\_\_\_  
 Получены из питомника \_\_\_\_\_  
 Дата получения \_\_\_\_\_  
 Дата выхода из карантина \_\_\_\_\_  
 Количество животных в группе \_\_\_\_\_

Метод оценки – реакция гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). Оцениваемый параметр – величина воспалительной реакции у иммунизированных мышей при повторном введении антигена/эритроциты барана (ЭБ) или тринитробензосульфоновая кислота (ТНБС)

**Иммунизация**

Дата \_\_\_\_\_ Антиген ЭБ ТНБС \_\_\_\_\_  
 Источник получения \_\_\_\_\_  
 Концентрация \_\_\_\_\_  
 Объем введения \_\_\_\_\_  
 Доза \_\_\_\_\_  
 Способ введения \_\_\_\_\_  
 Время введения \_\_\_\_\_

**Разрешающая инъекция**

Дата \_\_\_\_\_  
 Антиген ЭБ ТНБС \_\_\_\_\_  
 Источник получения \_\_\_\_\_  
 Концентрация \_\_\_\_\_  
 Объем введения \_\_\_\_\_  
 Доза \_\_\_\_\_  
 Способ введения \_\_\_\_\_  
 Время введения \_\_\_\_\_

**Оценка реакции**

Дата \_\_\_\_\_  
 Оцениваемый параметр – процент прироста массы исследуемой лапки по отношению к контрольной (индекс реакции)

*Результаты анализа*

№	Группы	Доза	Масса контрольной лапки (мг) ( $M \pm m$ )	Масса исследуемой лапки (мг) ( $M \pm m$ )	Индекс реакции % ( $M \pm m$ ) ответ	<i>p</i>
1	Положит. контроль					
2	Отрицат. контроль					
3	Препарат	1 доза				

4	-«-	-«-			
5	-«-	-«-			
6	-«-	-«-			
7	-«-	-«-			
8	-«-	-«-			
9	-«-	-«-			
10	Препарат сравнения	-«-			

**Заключение:**

Ответственный исполнитель \_\_\_\_\_  
 Должность \_\_\_\_\_  
 Дата \_\_\_\_\_ Подпись \_\_\_\_\_  
 Название учреждения-исполнителя \_\_\_\_\_  
 Подразделение \_\_\_\_\_  
 Адрес \_\_\_\_\_  
 Телефон \_\_\_\_\_  
 Факс \_\_\_\_\_

**Литература**

1. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. — Л., 1973.
2. Кудрина Г.П., Шашкина Л.Ф., Иванова В.М. и др. Методические рекомендации по оценке аллергенных свойств фармакологических средств. — М., 1988.
3. Кудрина Г.П., Буров Ю.В., Алтынбаева Р.Д. и др. Методические рекомендации по оценке иммунотоксических свойств фармакологических средств. — М., 1991.
4. Любимов Б.И., Коваленко Л.П., Федосеева В.Н. и др. Методические указания по оценке алергизирующих свойств фармакологических веществ. — М., 2000.
5. Мастернак Т.Б., Малкина Е.Ю., Ларин А.С. и др. Протективное действие ряда иммуномодуляторов и их влияние на активность макрофагов // Иммунология. — 1998. — № 1. — С. 33–56.
6. Мастернак Т.Б., Чижевская М.А., Иванова А.С., Манько В.М. Влияние иммуномодулирующих препаратов на индуцированную ФГА пролиферацию спленоцитов // Иммунология. — 1997. — № 4. — С. 27–31.
7. Медуницын Н.В., Буковский С.Н., Григорьева Л.В. и др. Порядок и методы контроля иммунологической безопасности вакцин. Общие методические принципы. — М., 1989.
8. Петров Р.В., Хаитов Р.М., Манько В.М. и др. Методические материалы по экспериментальному (фармакологическому) и клиническому испытанию иммуномодулирующего действия фармакологических средств. — М., 1984.
9. Ромейс Б. Микроскопическая техника. — М., 1954. — С. 1396–1399.
10. Туманян М.А., Кирилличева Г.Б. // Открытия. — 1986. — № 6. — С. 24.
11. Федосеева В.П., Шарецкий А.Н., Аристовская Л.В. Методические рекомендации по экспериментальному изучению иммунотоксических свойств химических факторов окружающей среды. — М., 1989.
12. Хаитов Р.М. Физиология иммунной системы. — М., 2001.
13. Хаитов Р.М., Атауллаханов Р.И., Иванова А.С. и др. Методические указания по оценке иммунотоксического действия фармакологических веществ. — М., 2000.
14. Cottier A., Turk J., Sobin L. A proposal for a standardized system of reporting human lymph node morphology in relation to immunological function // J. Clin. Patol. — 1973. — Vol. 26. — P. 317–331.
15. Dean J.H., Padarathsingh M.L., Jerrells T.R. Assessment of immunobiological effects induced by chemicals, drugs or food additives. I. Tier testing and screening approach. Drug Chem Toxicol. — 1979. — Vol. 2. — P. 5–17.
16. Descotes J., Verdier F. Popliteal Lymph Node Assay. — In Methods in Immunotoxicology, Vol. 1 G.R. Burleson, J.H. Dean, and A.E. Munson, Eds., Wiley-Liss, Inc., 1995 — P. 189–196.
17. Davies G.E. Immunotoxicity: Undesirable effect of inappropriate responses // Immunology Today. — 1983. — Vol. 4. — № 1. — P. 1–2.
18. Dietert R. R., Golemboski K. A. Immunotoxicological mechanisms. — in: Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine, Vol. 3/Ed. Meyers R. A — VCH, 1996. — P. 295–302.

19. English D., Andersen B.R. Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque // *J. Immunol Methods*. – 1974. – Vol.5. – № 3. – P. 249–252.
20. European Commission (1994) Risk Assessment of Existing Substances Technical Guidance Document X1/9I/S494-CN. Chapter 7. European Communities, Luxembourg.
21. Hinton D. M. Testing guidelines for evaluation of the immunotoxic potential of direct food: additives. – *Crit Rev. Fd. Sci. Nutr.* – 1992. – Vol. 32. – № 1. – P. 173–190.
22. Luster M.I., Munson A.E., Thomas P.T., et al. Development of a testing battery to assess chemical-induced immunotoxicity: National Toxicology Program's guidelines for immunotoxicity evaluation in mice // *Fundam Appl Toxicol.* – 1988. – Vol.10. – P. 2–19.
23. Luster M.I., Portier C., Pait D. G. et al. // *Immunotoxicology and risk assessment*. – in *Methods in Immunotoxicology*. – New York et al.: Wiley-Liss, Inc., 1995. – Vol.1. – P. 51–58.
24. Maloney C.G., Kutchera W.A., Albertine K.H., et al. Inflammatory agonist induce cyclooxygenase type 2 expression by human neutrophils // *J.Immunol.* – 1998. – Vol.160. – № 3. – P. 1402–1410.
25. Neuman D.A. Immunotoxicity testing and risk assessment: Summary of 1994 Workshop Immunotoxicology Technical Committee // *Fd. Chem. Toxic.* 1995. – Vol. 33. – № 10. – P. 887–894.
26. Pieters R. The popliteal lymph node assay: a tool for predicting drug allergy // *Toxicology*. – 2001. – Vol. 158. – № 1-2. – P. 65–69.
27. Sheng H., Batinic-Haberle I., Warner D.S. Catalitic antioxidants as novel pharmacologic approaches to treatment of ischemic brain injury // *Drug News Perspect.* 2002. – Vol. 15. – № 10. – P. 654–665.
28. Stanworth D.R. Current concepts in hypersensitivity. – In: *Immunotoxicology and Immunopharmacology* / Eds Dean J. H. et al – New York: Raven Press. 1985. – P. 91–99.
29. Wang X., Feurstein G.Z. Role of Immune and Inflammatory Mediators in CNS Injury // *Drug News Perspect.* 2000. Vol. 13. – № 3. – P. 133–140.