

**В. С. Мосієнко, М. Д. Мосієнко, З. Д. Савцова, В. С. Даниленко, М. Ю. Волкова\*, Л. М. Шинкаренко, Н. А. Щеглова, В. Г. Восп'яков, О. В. Свідро, Т. А. Меньок**

## **БЛАСТЕН - НОВЫЙ ОТЕЧЕСТВЕННЫЙ ИММУНОМОДУЛЯТОР БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ.**

*(Представлено акад. НАН і АМН України В. Фролькісом)*

Обобщены результаты доклинического изучения оригинального лечебного препарата “Бластен”, который получен из клеточных стенок *Lactobacillus Delbrueckii*. Показано, что бластен является эффективным иммуномодулятором. Спектр иммуномодулирующих эффектов бластена включает в себя: влияние как на реакции специфического иммунитета, так и неспецифической резистентности организма. Показана дозозависимость влияния бластена на определенные части иммунной системы, а также отличия в динамике иммуномодуляции при использовании высоких (мг/кг) и низких (мкг/кг) доз.

Экспериментальными и клиническими исследованиями 70-80-х годов убедительно показали, что нарушение иммунного состояния организма могут существенно влиять на эффективность и прогноз лечения.

Для коррекции иммунного статуса достаточно широко используются иммуномодуляторы – средства, которые модифицируют иммунный ответ путем прямого влияния на иммунокомпетентные клетки или опосредованно через изменения разных биологических реакций организма. В качестве иммуномодуляторов используются структурные компоненты и продукты микроорганизмов, цитокины, аминокислотные препараты, синтетические соединения, минеральные вещества, комбинированные средства и др. До сегодняшнего времени механизмы действия большинства иммуномодуляторов окончательно не установлены, но показано, что зависимость их эффекта от дозы часто не является линейной: наблюдается позитивная активность низких доз, средние не оказывают действия, а высокие оказывают противоположный эффект.

В связи с этим дозы, режим введения и продолжительность курса лечения, сочетания иммуномодуляторов с другими методами и способами могут иногда быть решающими для получения требуемого терапевтического эффекта. Иммуномодуляторы, которые сегодня используются в клинике, в определенных случаях нарушают гомеостатическое равновесие систем организма, в частности иммунной и нейроэндокринной. Следствием этого после кратковременной стимуляции клеточного иммунитета может быть развитие его депрессии. Эффективность ряда иммуномодуляторов может сильно варьировать в зависимости от индивидуальной чувствительности. Наконец, иммуномодулирующий эффект может объединяться с цитопротрофическим влиянием препаратов на иммунокомпетентные клетки, что может повышать риск развития лейкозов.

В связи с этим актуальным заданием является поиск и изучение новых иммуномодуляторов, применение которых давало бы минимум побочных эффектов, стимулировало бы не только иммунные реакции, но и сбалансированность иммунной системы в целом и ее адаптационные возможности. В последнее время в качестве таких иммуномодуляторов все большее внимание исследователей уделяется препаратам пробиотического происхождения, которые оказывают благоприятное влияние на организм, стабилизируя и нормализуя функции как иммунной, так и других систем. Только в Европе выполняются 7 программ, которые направлены на разработку, изучение и использование для иммунокоррекции пробиотиков из лактобацилл. Аналогичные исследования проводятся в США, Канаде, Японии.

Авторами совместно с сотрудниками предприятия "Энзим" (Ладыжин, Украина) разработан способ получения иммуномодулирующего препарата с клеточных стенок *Lactobacillus Delbrueckii*, которые получил название "Бластен".

Целью работы было изучение спектра, дозозависимости и продолжительности иммуномодулирующих эффектов препарата "Бластен" для обоснования и разработки схем его использования в комплексном лечении разных заболеваний.

Материалы и методы.

При исследовании общефармакологической и специфической активности бластена, согласно требований и рекомендаций

Фармакологического Комитета МЗ Украины исследовали субстанцию препарата и готовую лекарственную форму с наполнителем полиглиукином.

Исследования проводились на самцах и самках мышей линий А, СВА, С57В1/6, Ва1Ь/с, нелинейных; крысах разводки вивария ИЭПОР НАН Украины; а также кролях обоих полов из вивария ИЭПОР.

Комплексное исследование препарата заключалось в определении по методу “Беренса” острой и хронической токсичности субстанции и ГЛС, а также изучение их влияния на серию показателей специфического и неспецифического иммунитета: Т-клеточность селезенки и периферических лимфоузлов; реакцию лимфоцитов, периферических лимфоузлов *in vitro* на митогены; количество антителообразующих клеток (АОК) в селезенке после иммунизации эритроцитами барана (определение по методу Эрне); титры антител в сыворотке крови после иммунизации эритроцитами барана или вирусами гриппа; реакцию гиперчувствительности замедленного типа к эритроцитам барана (РГЗТ); реакцию «трансплантант против хозяина» в сублетальных облученных реципиентах (РТПХ); цитотоксическую активность природных киллерных клеток (ПКК); активность перитонеальных макрофагов (по способности продуцировать *in vitro* фактор некроза опухоли).

Все иммунологические показатели определяли с помощью стандартных методов, детально описанных в литературе. Математическую обработку проводили с использованием (t-критерия Стьюдента).

Для исследования влияния бластена на исследованные иммунологические характеристики использовался индекс модуляции (ИМ).

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.**

Изучение острой токсичности субстанции бластена на нелинейных мышах и крысах выявило ее низкий уровень – при внутрибрюшинном введении ЛД50 составляла 6,7-7,2 г/кг массы тела. ЛД50 для самцов обоих видов были ниже, чем для самок. При курсовом парентеральном введении 4 доз субстанции животным трех видов не отмечено нарушений состояния внутренних органов, за исключением

появления отдельных очагов реактивных изменений в лимфоидной ткани под влиянием наивысшей из курсовых доз. Раздражающий эффект, сенсibiliзирующее действие, аллергическое действие и пирогенность также отсутствовали. Совокупность результатов позволила охарактеризовать бластен как практически неопасный препарат, который не оказывает отрицательного воздействия на организм экспериментальных животных, а также не имеет тератогенного или эмбриотоксического действия. Изучение иммуномодулирующих возможностей бластена показало, что он активизирует широкий круг иммунологических реакций. При этом эффективные дозы ниже, чем минимальные токсические дозы для мышей в 625-56200 раз, а для крыс – в 650-48500 раз. Терапевтический индекс колебался от 1000 до 75000 независимо от состояния и вида животных. Важно, что существенную позитивную модуляцию специфической и неспецифической частей иммунной системы вызывали дозы препарата, которые практически не влияли на такие характеристики лимфоидной ткани, как клеточность и пролиферативная активность. В исследованном диапазоне доз отмечается достаточно четкая дозозависимость отдельных иммуномодулирующих эффектов (таблица). Так, через 5-7 дней после введения субстанции бластена наибольшее влияние на кооперативные реакции гуморального иммунитета (количество АУК, титры антител к гетерозеритроцитам и к вирусу грипа) составляла доза 0,000013 ЛД50. Доза 0,001 ЛД50 вызывала в это время максимальное повышение индуцированной митогенами РБТЛ, РГУТ и продукции фактора некроза опухолей макрофагами, которые были дополнительно стимулированы *in vitro*.

Наивысшие показатели РТПХ и активности ПКК зафиксированы через 7 дней после использования 0,01 ЛД50 препарата. Однако последнюю дозу не следует необоснованно включать в “оптимальный диапазон”, так как она повышает (без дополнительного влияния антигенов или неспецифических митогенов) пролиферативную активность лимфоцитов, а также имеет как положительную, так и отрицательные фазы иммуномодулирующего влияния.

При изучении динамики модулирующего действия разных доз субстанции бластена на отдельные иммунологические показатели выявлено, что доза 0,01 ЛД50 вызывает через 2 суток усиление

реакции лимфоцитов периферических лимфоузлов на митогены и увеличение активности макрофагов без дополнительной стимуляции ЛПС; через 5 дней отмечается повышение РГЗТ.

**Дозозависимость влияния бластена на индекс модуляции  
специфических и неспецифических иммунологических  
показателей, %**

Иммунологический показатель	ЛД50		
	0,01	0,001	0,000013
<b>Исходные характеристики вторичных лимфатических органов</b>			
Количество выделенных клеток из селезенки из лимфатических узлов	+82,5*	+37,1	+22,4
	+17,8	+4,0	+28,5
Удельная пролиферативная активность лимфоцитов из лимфатических узлов (включение 3Н-тимидина на 106 клеток)	+45,8	-11,8	-28,8
<b>РБТЛ на митогены</b>			
Т-клеточный	+8,4	+173,2*	+37,4
В-клеточный	+26,3	+131,4*	+24,3
<b>Кооперативные реакции гуморального иммунитета</b>			
Титр сывороточных гемагглютининов к эритро-цитам барана	+37,5/ +33,0	+25,0/ +33,0	+51,3*/ +66,6*
Титр сывороточных гемагглютининов к вирусу гриппа	+11,1	+25,0	+50,0*
Количество АОК в селезенке к эритроцитам барана	-25,1	+2,0	+44,3*
<b>Кооперативные реакции клеточного иммунитета</b>			
РГЗТ	0	+42,0	+5,0
РТПХ	+72	0	+29
<b>Активность неспецифических эффекторов клеточного иммунитета</b>			
Цитотоксичность ПКК	+325,4*	+103,4*	+44,1
Продукция фактора некроза опухолей макрофагами	-67,6*/ -57,4*	-17,8/ +105,0*	-31,0/ +31,9

**Примечание:** 1) в числителе – индексы модуляции, определенные в исследованиях на мышах линии СВА, которые характеризуются высоким уровнем реакции на введение эритроцитов барана, в знаменателе – индексы модуляции, определенные на мышах “низкорезагирующей” на эритроциты барана линии С57BL ; 2) в числителе – индексы модуляции продукции фактора некроза макрофагами без их дополнительной стимуляции *in vitro*; в знаменателе – индексы модуляции продукции фактора некроза опухоли макрофагами, которые были дополнительно костимулированы липополисахаридом; \* -  $P < 0,05$  по сравнению с абсолютными показателями контрольной группы.

Однако через 7-14 дней эти показатели уменьшаются до существенно более низких, чем в контроле. Динамика влияния ПКК аналогичная, однако несколько смещена во времени : существенное повышение через 7 дней , резкое падение через 14 дней. Наконец, позитивное влияние дозы 0,01 ЛД50 на формирование АОК к гетерозритроцитам не зафиксировано ни в одном из промежутков наблюдения. Наименьшая из изученных доз (0,000013 ЛД50) также повышала РБТЛ и РГЗТ, соответственно, через 2 и 5 дней. В дальнейшем уровни этих реакций снижались, однако ни в одном из случаев не становились ниже, чем в контроле. Клеточность селезенки существенно не изменялась, хотя и отмечалась тенденция к ее повышению через 7 дней. Относительное количество АОК к гетерозритроцитам , активность ПКК, а также активность макрофагов после влияния ЛПС постепенно выросли и достигали максимума через 14 дней, то есть уменьшение дозы препарата позволило избежать фазы негативной модуляции иммунологических реакций при сохранении мягкого позитивного влияния на иммунную систему.

Изучение дозозависимости и динамики иммуномодулирующего действия ГЛЗ “Бластена” подтвердило результаты, которые были получены при исследовании субстанции. Через 7-14 дней после одноразового парентерального введения ГЛЗ в дозах 0,05 и 0,01 ЛД50 отмечалось снижение, а в дозах 0,001, 0,0001, 0,00002, 0,000013 ЛД50 – стимуляция показателей гуморального и клеточного иммунитета. Максимальная и наибольшая продолжительность (до 4-5 недель) позитивной иммуномодуляции зарегистрирована после трехкратного подкожного введения ГЛС “Бластена” в дозе 0,000013 ЛД50 с интервалом 5-7 дней. Вместе с тем, широкий диапазон иммуномодулирующих влияний и эффективных доз указывает на возможность разработки разнообразных схем использования бластена,

которые были бы оптимальными для конкретных иммунопатологических состояний и заболеваний.

Следовательно, высокие дозы (67-72 мг/кг) и низкие (0,06-0,09 мг/кг) дозы бластена имеют разное влияние на отдельные части иммунной системы и неодинаковую динамику иммуномодулирующих эффектов. Низкие дозы стимулируют ответ лимфоцитов на митогены, кооперативные реакции специфического иммунитета и неспецифическую цитотоксичность лимфоцитов, однако не влияют на активность моноцитов/макрофагов.

Ни в одном из исследований не зафиксировано резких перепадов иммунологических параметров. Под влиянием высоких доз уже с 48 часов регистрируется стимуляция как специфического, так и неспецифического иммунитета, однако эта стимуляция носит транзиторный характер и сменяется затем падением исследуемых показателей ниже исходного уровня. Неоднозначность действия разных доз бластена на лимфоциты и макрофаги совпадает с данными про особенности влияния на эти клетки высоких и низких доз иммуномодуляторов другой группы – аминокислотных препаратов. Это позволяет предположить, что выявленная дозозависимость основана скорее не на особенности собственно иммуномодулирующих препаратов, а на филогенетически определенных расхождениях между лимфоцитами и макрофагами в чувствительности к экзогенным влияниям.

Сравнение бластена с ближайшим аналогом “Продигиозаном” (Россия) показало, что разработанный иммуномодулятор значительно эффективнее действует на реакции клеточного иммунитета. После однократного введения рекомендованных доз продигиозана стимуляция РГУТ не превышала 25%, стимуляция РТПХ – 50%. Оптимальные дозы бластена повышали показатели реакций в сравнении с контрольными, соответственно, на 40-45% и 70-100%. Кроме того, диапазон доз, которые являются эффективными в этих реакциях, у бластена значительно шире, чем у продигиозана (100-6000 мкг/кг и 125-500 мкг/кг, соответственно). Последнее уменьшает опасность возникновения эффекта отмены иммуномодуляции при курсовом использовании или в связи с повышенной чувствительностью и особенностями индивидуального иммунного статуса организма.

Было также показано, что по способности стимулировать продукцию антител при иммунизации мышей бластен в дозах 0,5-1,0 мг/кг не уступает полному адьюванту Фрейнда. Преимуществом бластена при этом является растворимость в физиологических растворах, в то время как адьювант Фрейнда эмульгируется в жировых растворителях. В 1996-1997 годах бластен успешно прошел I и II фазы клинических испытаний в комплексном лечении злокачественных новообразований, неспецифических бронхо-легочных заболеваний, гнойной хирургической инфекции и был рекомендован ФК МЗ Украины для промышленного производства и широкого внедрения в медицинскую практику.