

2. Бабаченко И.В., Курова Н.Н., Ценева Г.Я. и др. Новые подходы к диагностике и профилактике коклюшной инфекции. В кн.: *Актуальные вопросы инфекционной патологии у детей (диагностика и лечение): Материалы IV Конгресса педиатров-инфекционистов России*. М.; 2005: 26.
3. Бабаченко И.В. Клинико-лабораторные особенности коклюшной инфекции у детей в современных условиях. *Детские инфекции*. 2006; 5(22): 22–6.
4. Геворкян А.К., Галицкая М.Г., Ботвиньева В.В. Актуальные вопросы эпидемиологии и профилактики коклюшной инфекции. *Педиатрическая фармакология*. 2007; 4(1): 90–1.
5. Селезнева Т.С. Мониторинг иммуноструктуры детского населения к коклюшу в современных условиях. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2009; 2: 45–8.
6. Грачева Н.М., Малышев Н.А., Петрова М.С., Попова О.П., Борисова О.Ю., Келли Е.И., Абрамова Е.Н. *Коклюш (клиника, диагностика, лечение): Методические рекомендации*. М.; 2009.
7. Попова О.П., Петрова М.С., Борисова О.Ю., Котелева С.И. Клиника и диагностика коклюша у детей на современном этапе. В кн.: *Актуальные вопросы инфекционной патологии и вакцинопрофилактики: Материалы 8-го Конгресса педиатров-инфекционистов России 16–18 декабря 2009 г.* М.; 2009: 108.
8. Onorato I.M., Wassilac S.G. Laboratory diagnosis of pertussis the state of the art. *Pediatr. Infect. Dis.* 1987; 6: 555–8.
9. Pertussis infection in the children patients in modern conditions. *Detskie infektsii*. 2006; 5(22): 22–6. (in Russian)
10. Gevorkyan A.K., Galitskaya M.G., Botvin'eva V.V. Topical issues of epidemiology and prophylaxis of pertussis infection. *Pediatricheskaya farmakologiya*. 2007; 4 (1): 90–1. (in Russian)
11. Selezneva T.S. Monitoring of the immune structure of child population to pertussis in modern conditions. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni*. 2009; 2: 45–8. (in Russian)
12. Gracheva N.M., Malyshev N.A., Petrova M.S., Popova O.P., Borisova O.Yu., Kelli E.I., Abramova E.N. *Pertussis (Clinical Picture, Diagnostics, Medical Treatment): [Kokluch (Klinika, diagnostika, lechenie) Metodicheskie rekomendatsii]*. Moscow; 2009. (in Russian)
13. Popova O.P., Petrova M.S., Borisova O.Yu., Koteleva S.I. Clinical picture and diagnostics of pertussis in children patients at the present stage. In: Proceedings of VIIIth Congress of Pediatricians - Infectious Diseases Specialists in Russia, 16- 18 December. *[Aktual'nye voprosy infektsionnoy patologii i vaksino profilaktiki: Materialy 8-go Kongressa pediatrov-infektsionistov Rossii 16–18 December 2009]*. Moscow; 2009: 108. (in Russian)
14. Onorato I.M., Wassilac S.G. Laboratory diagnosis of pertussis: the state of the art. *Pediatr. Infect. Dis.* 1987; 6: 555–8.

Received 19.05.14

Поступила 19.05.14

## REFERENCES

1. Zaitsev E.M. *Peculiarities of Postinfectious and Postvaccinal Immunity about Pertussis: Diss.* Moscow; 2013. (in Russian)
2. Babachenko I.V., Kurova N.N., Tseneva G.Ya. et al. New approaches to diagnostics and prophylaxis of pertussis infection. In: *[Aktual'nye voprosy infektsionnoy patologii u detey (diagnostika i lechenie): Materialy IV kongressa pediatrov-infektsionistov Rossii]*. Moscow; 2005: 26. (in Russian)
3. Babachenko I.V. Clinical and laboratory peculiar properties of

## Сведения об авторах:

**Попова Ольга Петровна**, канд. мед. наук, ст. научн. сотр. клин. отдела ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского; **Скирда Татьяна Александровна**, канд. мед. наук, зав. лабораторией эпидемиологии кокковых инфекций ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского; **Фёдорова Ирина Михайловна**, канд. мед. наук, вед. научн. сотр. лаборатории клеточных и молекулярных основ иммунитета ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского; **Котелева Светлана Игоревна**, канд. мед. наук, научн. сотр. лаборатории клеточных и молекулярных основ иммунитета ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 615.373.012.8

**Козлов В.Г.<sup>1</sup>, Ивин Ю.Ю.<sup>2</sup>, Грачев В.П.<sup>2</sup>****ПРИМЕНЕНИЕ ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ ПЛАЦЕНТЫ ДЛЯ ОЧИСТКИ НОРМАЛЬНЫХ И ИММУННЫХ СЫВОРОТОК ЖИВОТНЫХ**

<sup>1</sup>ФГУП «Предприятие по производству бактерийных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова», 142782 РФ, г. Москва, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита. <sup>2</sup>ГУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова», 142782, г. Москва, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита

*Описан эффективный и экономичный способ удаления токсичных субстанций из нормальных и иммунных сывороток различных видов животных с помощью тканей человеческой плаценты. Процесс очистки не приводит к ощутимым потерям специфической активности и первоначального объема. Метод прост, не нуждается в применении специального оборудования и может быть использован в условиях малообъемного или лабораторного производства сывороточных препаратов. Обсуждаются возможные источники сывороточной токсичности и механизмы антитоксической активности плаценты.*

Ключевые слова: *очистка сывороток; плацента.*

Для цитирования: *Эпидемиология и инфекционные болезни. 2015, 20 (5): 48–51.*

Для корреспонденции: **Козлов Виталий Григорьевич**, канд. мед. наук, зав. отд. диагностических препаратов ФГУП «Предприятие по производству бактерийных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова», e-mail: vgzozlov@mail.ru

For correspondence: **Kozlov V.G.**, e-mail: vgzozlov@mail.ru

*There was described an efficient and economical approach for the removal of toxic substances from normal and immune sera from various species of animals with the use of human placenta tissue. Purification brings about perceptible losses of neither serum-specific activity nor the original volume. Being simple the method does not require any special equipment and can be used in conditions of low-volume or in laboratory production of serum preparations. There are considered as well possible origins of serum toxicity as mechanism of antitoxic activity of placenta.*

Key words: sera purification; placenta.

For citation: *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni. 2015; 20(5): 48–51. (In Russ.)*

Нормальные и специфические сыворотки млекопитающих широко применяются в лечебно-профилактических и диагностических целях, а также являются неотъемлемой частью различных исследовательских проектов. Недостатком многих сывороточных препаратов, существенно ухудшающих их эксплуатационные характеристики, является токсичность. В частности, токсичность, проявляемая кроличьими поликлональными энтеровирусными сыворотками (ЭДС) отечественного производства в отношении индикаторных клеток, используемых в регламентированной ВОЗ диагностической реакции нейтрализации, способствует ложноотрицательной интерпретации получаемых результатов [1]. Необходимость снижения или устранения токсичности ЭДС вызвана тем, что эти препараты являются диагностическим ресурсом, широко применяемым при выполнении на территории Российской Федерации программы ВОЗ по эпидемиологическому надзору за энтеровирусами [2].

Очистке ЭДС длительное время препятствовали представления о «видовом» характере цитотоксичности кроличьих сывороток и связи этого эффекта с иммуноглобулинами [3–5]. Так как эти точки зрения не получили экспериментального подтверждения [1], нами были предприняты поиски эффективных методов очистки, приемлемых для малообъемного серийного производства энтеровирусных сывороток. Большинство существующих промышленных и лабораторных методов удаления токсичных примесей рассчитаны на обработку значительных количеств сывороток и обычно сопровождаются потерей 10–50% объема целевых продуктов. Кроме того, многоступенчатые схемы очистки требовали использования специального оборудования и реагентов, существенно увеличивающих операционные затраты. Более рациональной представлялась очистка энтеровирусных сывороток с применением упрощенных технологий, не приводящих к денатурации белков. В наших предварительных экспериментах были получены удовлетворительные показатели остаточной токсичности отдельных ЭДС, обработанных тканями человеческой плаценты [6]. В настоящем сообщении приводятся данные об оптимальных режимах обработки тканями человеческой плаценты пригодных для очистки всех токсичных ЭДС, а также токсичных нормальных сывороток животных некоторых видов.

## Материалы и методы

Плаценты получали от доноров с неотягощенным анамнезом и без патологии беременности. Препараты цельных плацент сохраняли от момента изъятия до обработки ( $\approx 10$ – $12$  ч) в фосфатно-солевом буфере, pH 7,4 (ФСБ) при  $4^{\circ}\text{C}$ . Первичную обработку плацент (удаление оболочки и сосудистых сплетений, разделение паренхимы на фрагменты площадью  $\approx 1,5$  см<sup>2</sup>) проводили с соблюдением правил асептики и антисептики. Фрагменты паренхимы индивидуальных плацент размельчали в течение 0,5–3 мин в гомогенизаторе (Waring 8010S,  $\approx 17$  000 об/мин) с целью увеличения площади контакта с очищаемыми сыворотками. Размельченные ткани отмывали до обесцвечивания в повторных циклах центрифугирования (15 мин при 1000 g), используя в каждом цикле новые порции ФСБ. Обесцвеченный гомогенат сохраняли при  $-20^{\circ}\text{C}$  в виде 20% суспензии в ФСБ.

Продуцентами ЭДС были кролики породы русская шиншилла (питомник «Электрогорский» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России) и овцы романовской породы (данных о поставщике не имеется). Нормальные сыворотки были получены от африканских зеленых мартышек, предназначенных для оценки нейровирулентности пероральной полиомиелитной вакцины, и от крупного рогатого скота (фирма «Фуру»). Кроликов, овец и крупный рогатый скот разводили и содержали в открытых (конвенциональных) системах. Обезьяны были отловлены в местах естественного обитания (Танзания).

Очистке были подвергнуты смеси токсичных кроличьих сывороток, специфичных к полиовирусу 1, 2, 3-го типов, к вирусам Коксаки А 2, 4, 7, 9, 10 типов, Коксаки В 1–6 типов, ЕСНО 2–9, 11–13, 16, 20, 21, 25, 27, 29, 30, 33-го типов, к энтеровирусам 68–71 (каждая смесь включала 5–7 однотипных индивидуальных сывороток), 3 токсичные овечьи сыворотки, специфичные к полиовирусу 1, 2, 3-го типов, а также токсичные нормальные сыворотки трех обезьян и образцы пяти серий токсичных нормальных сывороток крупного рогатого скота.

Образцы сывороточных смесей и индивидуальных сывороток объемом 10 мл каждая термоинактивировали (30' при  $56^{\circ}\text{C}$ ), смешивали по отдельности с тканями плацент различной дисперсности в объемных соотношениях 1,0 $\times$ 0,5; 1,0 $\times$ 1,0; 1,0 $\times$ 2,0 и инкубировали при  $36^{\circ}\text{C}$  в течение 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 ч

с перемешиванием через каждые 15 мин. После этого ткани плацент осаждали в рефрижераторной центрифуге (15 мин при 6000g). Полученные сыворотки фильтровали (фильтры Millipore AAWP 0,8 мкм, DAWP 0,65 мкм, HAWP 0,45 мкм, GSWP 0,22 мкм) и измеряли уровни их токсического воздействия на клетки RD и HEp-2-C в условиях микрометода реакции нейтрализации.

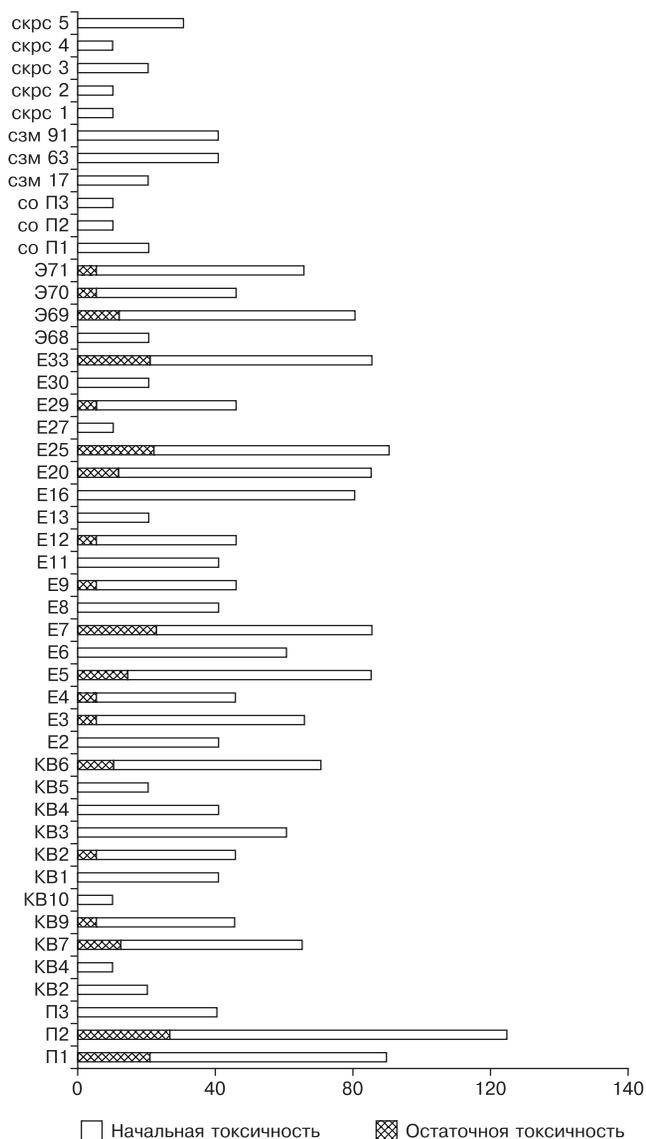
### Результаты и обсуждение

На основании анализа профилей токсичности очищенных сывороток были определены режимы получения максимально активных тканей плацент и оптимальные условия их применения. Наибольшей адсорбционной емкостью обладали ткани плацент, размельчаемые в течение 1,5–2,0 мин. Контакт с таких тканей с эквивалентными объемами нормальных и иммунных сывороток (2 ч при 36°C и 18–20 ч при 4°C) приводил к максимальному снижению токсичности. Было отмечено, что показатели остаточной токсичности сывороток, обработанных тканями индивидуальных плацент, незначительно различаются. Стабильные результаты очистки сывороток были получены после их обработки смесями тканей нескольких плацент.

На диаграмме представлены результаты однократной обработки образцов токсичных иммунных и нормальных сывороток тканями плацент в оптимальных условиях. Можно видеть, что токсичность большей части иммунных сывороток и всех нормальных сывороток была ниже определяемого уровня (разведение 1:5). Остаточная токсичность определялась в диапазоне разведений сывороток 1:5–1:30, что было в 4–8 раз ниже их рабочих разведений, используемых в реакции нейтрализации. Полная очистка таких сывороток достигалась путем их повторной обработки тканями плаценты.

Помимо высокой эффективности очистки иммунных и нормальных сывороток тканями плаценты преимуществами метода было сохранение целевыми продуктами своего первоначального объема, проведение очистки на стандартном лабораторном оборудовании, отсутствие значительных операционных затрат. Возможность длительной консервации тканей плацент (не менее трех лет при -20°C) позволяла проводить предварительно оценку их функциональной активности и, следовательно, прогнозировать результаты очистки сывороток.

Сохранение очищенными иммунными сыворотками начальной специфической активности подтвердили данные об иммунонезависимости цитотоксичности, но оставили нерешенным вопрос о детерминантах этого свойства. Ранее было показано, что цитотоксичность является характерной особенностью большинства ЭДС, полученных в результате внутривенных иммунизаций кроликов, и практически отсутствует в сыворотках кроликов, иммунизированных внутримышечно [7]. Известно, что массивное поступление антигенов в кровеносное



Показатели токсичности сывороток животных до и после обработки тканями плаценты.

По оси ординат – кролики сыворотки полиомиелитные (П), Коксаки А (КА), Коксаки В (КВ), ЕСНО (Е), энтеровирусные (Э), сыворотки овец (со); цифрами обозначены серотипы сывороток.

Нормальные сыворотки зеленых марьяшек (сзм); цифрами обозначены номера обезьян.

Нормальные сыворотки крупного рогатого скота (скрс), цифрами обозначены их порядковые номера.

русло при многократных внутривенных инъекциях приводит наряду с выработкой антител к формированию комплексов антиген–антитело, нарушающих целостность стенок кровеносных сосудов [8]. Развивающиеся в результате этого местные и общие ответные реакции воздействуют на гуморально-клеточную реактивность организма, изменяют гематологические и биохимические показатели и являются причиной патологических изменений внутренних органов [9]. Возможно, что подобные эффекты могут быть причинами сывороточного токсикоза. Следует отметить, что сдвиг физиологических констант наблюдается также при несоблюдении правил зоогигиены в питомниках и в вивариях, а также в

результате различных стрессовых ситуаций, нарушающих симбиоз организма с аутофлорой и активизирующих факультативные микроорганизмы. Подобные ситуации нередки при содержании животных в конвенциональных системах.

Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о распространении природных защитных свойств человеческой плаценты на цитотоксичные субстанции, присутствующие в нормальных и иммунных сыворотках животных. Кроме этого они подтверждают селективность барьерной функции плаценты, являющейся не только мощным фактором врожденного иммунитета, но и источником различных неспецифических защитных реакций, активирующихся при беременности. В физиологических условиях тканеспецифическая функция плаценты, проявляющаяся в инактивации чужеродных белков, обеспечивается протеолитическими свойствами трофобласта. Его элементы активно экспрессируют антимикробные субстанции HBD 1–3 и элафин, препятствующие проникновению патогенных продуктов из крови матери к плоду [10, 11]. Возможно, что указанные структуры и субстанции предохраняют плод от токсичных антител, циркулирующих в материнской крови во II–III триместрах беременности, в частности от природных иммуноглобулинов класса M [12, 13]. Имеются сведения о рецепторном механизме проницаемости биологического барьера плаценты иммуноглобулинами класса G [14]. Полученные нами данные предполагают участие аналогичных механизмов в обеспечении защитного ресурса плаценты в отношении токсинов сывороток животных.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Козлов В.Г., Викторова Е.Г., Набатников П.А.. Цитотоксические свойства кроличьих энтеровирусных диагностических сывороток. Особенности и локализация. *Вопросы вирусологии*. 2009, 1: 22–7.
2. *Рекомендации по эпидемиологическому надзору за энтеровирусами для поддержки программы ликвидации полиомиелита*. Женева. ВОЗ. 2005.
3. Bolande R.P., Arnold D.C. Natural cytotoxicity of human serum. A natural IgM antibody sensitizes transformed murine cells to lytic action of complement. *Pathol. Immunopathol. Res.* 1989, 8: 46–60.
4. Colley D.G., Waksman B.H. Cytotoxic effect of normal rabbit serum on rat lymphoid cells. *Transplantation*. 1970; 96: 395–401.
5. Fedoroff S., Cook B. Interaction between cells and cytotoxic sera in cell cultures. *Pathol. Biol.* 1961, 9: 584–90.
6. Козлов В.Г. Поликлональные энтеровирусные диагностические сыворотки нового поколения. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2014; 3: 51–6.
7. Козлов В.Г., Викторова Е.Г. Оценка эффективности и реактогенности эмульсионных адъювантных систем при изготовлении поликлональных энтеровирусных диагностических сывороток. *Вопросы вирусологии*. 2011; 2: 41–6.
8. Doherty P.C. Cell-mediated cytotoxicity. *Cell*. 1993, 75: 607–12.
9. Карпов С.П., Пререп С.М., Синельников Г.Е., Федоров Ю.В. *Гипериммунные сыворотки*. Томск; 1976: 82–90.
10. Buhimschi I.A., Jabr M., Buhimschi C.S. et al. The novel antimicrobial peptide beta3-defensin is produced by the amnion: a

- possible role of the fetal membranes in innate immunity of the amniotic cavity. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2004; 191: 1678–87.
11. King A.E., Paltoo A., Kelly R.W. et al. Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes. *Placenta*. 2007; 28: 161–9.
  12. Bolande R.P., Mayer D. The cytotoxicity of human neuroblastoma cell by natural IgM antibody-complement system in pregnancy serum. *Cancer Invest.* 1990; 8: 603–11.
  13. Ollert M.W., David K., Schmitt C. et al. Normal human serum contains a natural IgM antibody cytotoxic for human neuroblastoma cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1996; 93: 4498–503.
  14. McNabb T., Koh T.Y., Dorrington K.J., Painter R.H.. Structure and function of immunoglobulin domains. V. Binding of immunoglobulin G on fragments to placental membrane preparations. *J. Immunol.* 1976, 117: 882–8.

Поступила 04.06.15

#### REFERENCES

1. Kozlov V.G., Viktorova E.G., Nabatnikov P.A. Cytotoxic properties of diagnostic rabbit sera to enteroviruses. Specific features and localization. *Voprosy virusologii*. 2009; 1: 22–7. (in Russian)
2. *Guidance on Laboratory Studies of Poliomyelitis. [Rekomendatsii po epidemiologicheskomy nadzoru za enterovirusami dly podderzhki programmy likvidatsii poliomielita]*. 4<sup>th</sup> ed. Geneva: WHO; 2005. (in Russian)
3. Bolande R.P., Arnold D.C. Natural cytotoxicity of human serum. A natural IgM antibody sensitizes transformed murine cells to lytic action of complement. *Pathol. Immunopathol. Res.* 1989, 8: 46–60.
4. Colley D.G., Waksman B.H. Cytotoxic effect of normal rabbit serum on rat lymphoid cells. *Transplantation*. 1970; 96: 395–401.
5. Fedoroff S., Cook B. Interaction between cells and cytotoxic sera in cell cultures. *Pathol. Biol.* 1961; 9: 584–90.
6. Kozlov V.G. New generation of polyclonal enteroviral diagnostic sera. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni*. 2014; 3: 51–6. (in Russian)
7. Kozlov V.G., Viktorova E.G. Evaluation of the efficiency and reactogenicity of emulsion-based adjuvant systems in the manufacture of polyclonal enteroviral diagnostic sera. *Voprosy virusologii*. 2011; 2: 41–6. (in Russian)
8. Doherty P.C. Cell-mediated cytotoxicity. *Cell*. 1993; 75: 607–12.
9. Karpov S.P., Preger S.M., Sinelnikov G.E., Fedorov Yu.V. *Hyperimmune Serum. [Giperimmunnye syvorotki]*. Tomsk. 1976; 82–90. (in Russian)
10. Buhimschi I.A., Jabr M., Buhimschi C.S. et al. The novel antimicrobial peptide beta3-defensin is produced by the amnion: a possible role of the fetal membranes in innate immunity of the amniotic cavity. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2004; 191: 1678–87.
11. King A.E., Paltoo A., Kelly R.W. et al. Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes. *Placenta*. 2007, 28: 161–9.
12. Bolande R.P., Mayer D. The cytotoxicity of human neuroblastoma cell by natural IgM antibody-complement system in pregnancy serum. *Cancer Invest.* 1990; 8: 603–11.
13. Ollert M.W., David K., Schmitt C. et al. Normal human serum contains a natural IgM antibody cytotoxic for human neuroblastoma cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1996; 93: 4498–503.
14. McNabb T., Koh T.Y., Dorrington K.J., Painter R.H. Structure and function of immunoglobulin domains. V. Binding of immunoglobulin G on fragments to placental membrane preparations. *J. Immunol.* 1976, 117: 882–8.

Received 04.06.15

#### Сведения об авторах:

**Ивин Юрий Юрьевич**, мл. науч. сотр. Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова; **Грачев Виктор Павлович**, доктор биол. наук, проф., гл. науч. сотр. Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова.