

Изучение специфической и общей фармакологической активности, иммуотоксичности и аллергенности вакцины РЕСАН

В.В. Янченко, А.В. Янченко, Л.К. Янченко

ОДО Научно-исследовательское коллективное предприятие РЕСАН, г. Витебск, Беларусь

The results of experimental study on specific and general pharmaceutical activeness, immunotoxicity and allergenicity of the vaccine RESAN

U.V Yanchanka, A.V Yanchanka, L.K. Yanchanka

The Scientific Research Enterprise "RESAN", Belarus

Аннотация

Исследования на крысах-опухоленосителях показали, что вакцина РЕСАН усиливает противоопухолевый ответ крыс против ряда перевивных опухолей (лимфосаркомы Плисса, карциносаркомы Уокер-256, саркомы-45, альвеолярного рака печени РС-1). Система иммунитета вакцинированных крыс способна уничтожить саркому-45 объёмом около 1 см³, (max-3 см³), карциносаркому Уокер-256 объёмом около 9 см³, (max-35 см³). Кроме этого, применение вакцины увеличивало среднюю продолжительность жизни павших животных. Введение вакцины РЕСАН не влияло на рост гепатомы 27.

При сравнении результатов профилактической РЕСАН-вакцинации и РЕСАН-терапии количество излеченных животных и торможение роста опухоли было выше в группах вакцинации. Эффективная доза вакцины РЕСАН находилась в интервале 48-1400 мг/кг массы крысы.

Вакцина РЕСАН не оказывала влияния на терморегуляторную функцию кроликов при подкожном введении в дозах 10 и 100 мг на 1 кг массы тела в течение 5-ти часового периода наблюдений. Её подкожное введение в дозе 10 и 100 мг на кг массы животного не оказывало влияния на поведение крыс. При проведении реакции кожной анафилаксии на морских свинках отмечено развитие реакции гиперчувствительности I типа легкой степени тяжести. У крыс, получавших вакцину в дозе 3 и 30 мг на одно животное, в тесте дегрануляции тучных клеток IgE-зависимые реакции на введение вакцины отсутствовали. У крыс, получавших вакцину в дозе 3 мг, выявлены лёгкие иммунокомплексные реакции. У крыс, получавших вакцину в дозе 30 мг, помимо лёгких иммунокомплексных реакций у 10% животных выявлены иммунокомплексные реакции средней степени тяжести. Метод накожной аппликации не выявил видимой реакции со стороны кожи ни у одной крысы в дозах 100 и 300 мг/мл.

Ключевые слова

Противоопухолевая вакцина РЕСАН, активность, иммуотоксичность, аллергенность, саркома, карцинома, крысы, кролики, морские свинки

Summary

The pre clinical study on the rats carrying tumors showed that the vaccine RESAN increase the antitumor response in rats against a number of implanted tumors (lymphosarcoma PLISS, carcinosarcoma Walker-256, sarcoma-45, alveolar cancer liver PC-1). The immune system of vaccinated rats is capable of destroying sarcoma-45 of size 1 cm³, (maximum-3 cm³), carcinosarcoma Walker 256 - 9 cm³, (max- 35 cm³). Beside this, it was noticed that the animals that received vaccine lived longer. The vaccine injections did not cause any impact on the growth of hepatoma 27. The effectiveness of the vaccine depended on the specific histological structure of the tumors. If we compare the 2 study groups: animals from vaccinating group and animals from therapeutic group, the survival rate as well as tumor growth arrest was better in the animals from vaccinating group. The most effective dose of vaccine ranged from 48 to 1400 mg/kg body weight of rats.

RESAN vaccine showed no effect on the thermo regulating system of rabbits for 5 hours of observation when it was introduced subcutaneous at the dose 10 and 100 mg per kg body weight. The subcutaneous introduction of vaccine at the dose 10 and 100 mg per kg body weight showed no effects on the general behavior of the rats. During the study on the anaphylactic skin reaction, the mild type 1 hypersensitivity to the drug RESAN was observed in guinea-pigs. In rats receiving vaccine at the dose 3 and 30 mg per one animal in the study for degranulation of mast cells, no IgE-dependent reaction to the injected vaccine was noticed. A mild immune-complex reaction was observed in the rats receiving 3 mg of vaccine RESAN. The rats receiving 30 mg of vaccine, besides the mild immune-complex reactions, 10% of the animals also developed moderate type of immune-complex reaction. The skin surface application of vaccine caused no seen skin reaction in any of the rats which received vaccine at the doses 100 and 300 mg/kg.

Key words

Antitumor vaccine RESAN, activity, immunotoxicity, allergenicity, sarcoma, carcinoma, rats, rabbits, guinea-pigs.

Всемирной организацией здравоохранения разработаны международные стандарты тест-систем и животных для оценки противоопухолевых препаратов [1, 2]. В стандартные тест-системы используемые в настоящее время для оценки противоопухолевых препаратов входит ряд перевивных опухолей, в том числе лимфосаркома Плисса, саркома-45, карциносаркома Уокер-256, альвеолярный рак печени РС-1, саркома М-1, гепатома 27. Согласно критериям ВОЗ препарат, обладающий противоопухолевой активностью, должен давать статистически достоверное торможение роста опухоли или статистически достоверное увеличение средней продолжительности жизни животных. Исследование токсичности, раздражающего и сенсибилизирующего действия проводили в соответствии с международными требованиями [3-6]. Действующим веществом вакцины РЕСАН являлись гликопротеины (фракция альфа-2-бета) из тканей *G. domesticus*.

Цель работы

Изучить в экспериментах влияние имитатора опухолевых антигенов вакцин РЕСАН (патент Республики Беларусь №5942) на рост перевивных злокачественных опухолей у крыс, ее иммунотоксичность и аллергенность.

Материалы и методы

Культуры опухолевых клеток лимфосаркомы Плисса и саркомы-45 были любезно предоставлены в 1992 году заведующим кафедрой клинической фармакологии Витебского государственного медицинского института, кандидатом медицинских наук, доцентом Франковым И.А.

Культуры опухолевых клеток саркомы-45, карциносаркомы Уокер-256, альвеолярного рака печени РС-1, саркомы М-1, гепатомы 27 были любезно предоставлены в 1996 году доктором медицинских наук Истоминым Ю.П., Научно-исследовательский институт онкологии и медицинской радиологии Министерства Здравоохранения Республики Беларусь.

Лабораторные испытания вакцины РЕСАН проводили на животных-опухоленосителях (белых крысах). Эксперименты были выполнены на 1549 животных (948 животных использовали для перевивки опухоли, в соответствии с требованиями ВОЗ).

Поддержание культуры опухоли проводили следующим образом. После гистологической оценки каждую культуру опухолевых кле-

ток вводили 3-м крысам, по 1,0 мл 10% взвеси клеток в паховую область, предварительно обработав место введения раствором 96% спирта. Для дальнейшей перевивки использовали опухоли от тех животных, у которых трансплантированная им опухоль имела характерную скорость роста. Животное-опухоленоситель подвергали эвтаназии в стерильной операционной комнате. Обработывали операционное поле раствором 96% спирта. При помощи стерильных ножниц и пинцета отделяли кожу над областью локализации опухоли, иссекали опухоль и помещали в стерильные мензурки с раствором Хэнкса. Кусочки опухоли отмывали от крови и переносили в стерильный гомогенизатор. Гомогенизатор представлял собой полую трубку, на один конец которой навинчивалось сито с диаметром пор 0,3 мм, со второй стороны закреплялся поршень с винтообразным нажимным устройством. Из измельченной опухолевой ткани готовили 10% взвесь для трансплантации, которую вводили 3 крысам, по 1,0 мл 10% взвеси клеток в паховую область, предварительно обработав место введения раствором 96% спирта. Поддерживали культуры опухолевых клеток на беспородных белых крысах, постоянно перевивая опухоль 1 раз в 7-14 дней в зависимости от типа опухоли.

Специфическая противоопухолевая активность вакцины проверялась на саркоме-45, карциносаркоме Уокер-256, лимфосаркоме Плисса, альвеолярном раке печени РС-1, саркоме М-1, гепатоме 27. Опухоль трансплантировали подкожно по 0,2-1,0 мл 1-20% взвеси клеток. В 1996 году часть экспериментов провели в Научно-исследовательском институте онкологии и медицинской радиологии Министерства Здравоохранения Республики Беларусь (договор от 5 января 1996 года).

Вакцину вводили подкожно, внутримышечно, внутрикожно, комбинированно, внутриопухолево, предварительно растворив в стерильном 0,9% растворе хлорида натрия. Доза вводимой вакцины была от 10 до 1200 мг на одно животное. Кратность введения была от 1 до 21 дня, препарат вводили непрерывно или курсами.

Методы проведения основных экспериментов описаны ниже.

Лимфосаркома Плисса

Первые исследования вакцины РЕСАН были проведены на лимфосаркоме Плисса. В этом эксперименте принимали участие 42 жи-

вотных, которые были разделены на 3 группы, по 14 животных в каждой группе. Животным первой опытной группы «РЕСАН» вводили в дозе 100 мг на одно животное за 1 неделю до трансплантации 1,0 мл 10% взвеси клеток лимфосаркомы Плисса. Животным второй опытной группы «РЕСАН» вводили через 1 неделю после трансплантации 1,0 мл 10% взвеси клеток лимфосаркомы Плисса в дозе 100 мг на одно животное, ежедневно, в течение 7 дней. Животным третьей группы РЕСАН не вводили, они служили контролем для двух первых групп.

Альвеолярный рак печени РС-1

Важным был вопрос: какое количество опухолевых клеток система иммунитета крысы может уничтожить самостоятельно. Для этого был поставлен эксперимент на 12 животных. В каждой группе было по 3 животных. Крысам первой группы подкожно, в левую паховую область трансплантировали 0,4 мл 10% взвеси клеток альвеолярного рака печени РС-1. Крысам второй группы аналогично трансплантировали 0,4 мл 1% взвеси клеток РС-1. Животным третьей группы трансплантировали 0,4 мл 0,1% взвеси клеток РС-1, а четвёртой группы – 0,4 мл 0,01% взвеси клеток РС-1.

В одном эксперименте участвовали 20 животных (10 опытных и 10 контрольных), за 22 дня до трансплантации 0,4 мл 10% взвеси клеток РС-1 опытным животным однократно подкожно вводили 33 мг вакцины. В другом эксперименте участвовало 40 животных (20 опытных и 20 контрольных), за 22 дня до трансплантации 0,4 мл 5% взвеси клеток РС-1 опытным животным однократно подкожно вводили 33 мг вакцины.

Гепатома 27

В эксперименте участвовали 34 животных (12 вакцинация, 12 терапия и 10 контрольных). Животным группы вакцинации РЕСАН вводили однократно подкожно в дозе 30 мг. Через 14 дней всем животным трансплантировали 0,5 мл 10% взвеси клеток гепатомы 27 под кожу паховой области. Животным опытной группы терапия вакциной РЕСАН вводили по 100 мг подкожно, на протяжении 3 дней, начиная со второго дня после трансплантации 0,5 мл 10% взвеси клеток гепатомы 27. Животные контрольной группы вакцину не получали.

Затем этот эксперимент с гепатомой 27 был повторён на удвоенном количестве животных каждой группы.

Саркома-45

В одном эксперименте участвовали 36 животных (18 опытных и 18 контрольных). Опытным животным «РЕСАН» вводили однократно подкожно в дозе 30 мг. Через 33 дня всем животным трансплантировали 0,5 мл 10% взвеси клеток саркомы-45 под кожу паховой области.

В другом эксперименте участвовало 49 животных (20 опытных и 19 контрольных). Опытным животным «РЕСАН» вводили однократно подкожно в дозе 30 мг. Через 33 дня всем животным трансплантировали 0,2 мл 5% взвеси клеток саркомы-45 под кожу паховой области.

Нами был проведен эксперимент на 28 животных с саркомой-45 (14 опытных и 14 контрольных) по внутриопухолевому введению вакцины. На 14 сутки после трансплантации в развившуюся опухоль животных опытной группы вводили 50 мг вакцины, растворённой в 0,5 мл физиологического раствора.

Карциносаркома Уокер-256

В эксперименте участвовали 120 животных, по 20 самок в каждой группе. Животным группы вакцинации-3 РЕСАН вводили по 100 мг подкожно, на протяжении 3 дней, начиная с 34 дня до трансплантации карциносаркомы Уокер-256 (0,3 мл 10% взвеси под кожу наружной поверхности бедра). Группе вакцинации-6 РЕСАН вводили по 100 мг подкожно, на протяжении 6 дней, начиная с 34 дня до трансплантации опухоли. Животным группы терапии-3 РЕСАН вводили по 100 мг подкожно, на протяжении 3 дней, начиная со второго дня после трансплантации карциносаркомы Уокер-256. Группе терапии-7 РЕСАН вводили по 100 мг подкожно, на протяжении 7 дней, начиная со второго дня после трансплантации опухоли, а группе терапии-15 РЕСАН вводили по 100 мг подкожно, на протяжении 15 дней, начиная со второго дня после трансплантации опухоли. Животные контрольной группы вакцину не получали.

Неоднократно проводили эксперименты по повторному привитию перевивной опухоли излеченным после вакцинации «РЕСАН» животным. Излеченным от карциносаркомы Уокер-256 животным пересаживали повторно или карциносаркому Уокер-256, или саркому, или гепатому 27.

Влияние вакцины РЕСАН на основные функции лабораторных животных проводили на кроликах, крысах, морских свинках, мышках.

Оценивали влияние вакцины на температуру тела, поведение животных, белковый, углеводный, жировой и минеральный обмен, влияние на клетки системы иммунитета.

Влияние вакцины на температуру тела изучали на 60 кроликах, которые были разделены на 3 группы: две опытные и контрольную (по 10 самцов и 10 самок в каждой группе) в возрасте 4 месяцев.

Перед введением препарата у каждого кролика дважды с интервалом 30 минут измеряли температуру. В эксперимент брали кроликов, у которых различия в показателях температуры не превышали 0,2°C. В противном случае кроликов для исследования не использовали. Результат последнего измерения принимали за исходную температуру. Вакцину вводили не позднее, чем через 30 минут после последнего измерения температуры. Последующее измерение температуры проводили 5 раз с промежутками в один час.

Кроликам 1 группы вакцину РЕСАН вводили в дозе 10 мг препарата на 1 кг массы кролика. Кроликам 2 группы вакцину РЕСАН вводили в дозе 100 мг препарата на 1 кг массы кролика. Для растворения вакцины использовали 1 мл физиологического раствора. Кроликам 3 группы вводили 1 мл физиологического раствора, они служили контролем для животных 1 и 2 групп.

Влияние вакцины на поведение животных изучали в тесте «открытое поле» на белых 150 крысах (по 25 самцов и 25 самок в каждой группе) в возрасте 3,5 месяцев.

Крысам 1 группы вводили 1 мл физиологического раствора, они служили контролем для животных 2 и 3 групп.

Крысам 2 группы вакцину РЕСАН вводили в дозе 10 мг препарата на 1 кг массы крысы. Крысам 3 группы вакцину РЕСАН вводили в дозе 100 мг препарата на 1 кг массы крысы. Для растворения вакцины использовали 1 мл физиологического раствора.

Исследование поведения крысы проводили через 30 минут после инъекции. Животное помещали в центр «открытого поля» и наблюдали 3 минуты за его поведением. Установка «открытое поле» представляла собой круглую площадку белого цвета диаметром 1 метр с 16 отверстиями в полу, расчерченную на 24 квадрата.

Влияние вакцины на белковый, углеводный, жировой и минеральный обмен оценивали по результатам биохимических исследований

крови животных, получавших вакцину и животных контрольной группы.

Крысы получали вакцину «РЕСАН» следующим образом. Животным 1 группы ее вводили подкожно, 1 раз в день, в дозе 50 мг/кг, в течение 1 месяца. Животным 2 группы «РЕСАН» вводили подкожно, 1 раз в день, в дозе 500 мг/кг, в течение 1 месяца. Животные 3 группы получали «РЕСАН» с пищей, 1 раз в день, в дозе 500 мг/кг, в течение 1 месяца. Животные 4 группы получали «РЕСАН» с пищей, 1 раз в день, в дозе 5 г/кг, в течение 1 месяца. Животные 5 группы не получали «РЕСАН» и служили контролем для животных 1-4 групп. Животные 6 группы получали «РЕСАН» с пищей, 1 раз в день, в дозе 500 мг/кг, в течение 6 месяцев. Животные 7 группы получали «РЕСАН» с пищей, 1 раз в день, в дозе 5 г/кг, в течение 6 месяцев. Животные 8 группы не получали «РЕСАН» и служили контролем для животных 6-7 групп. Животные 9 группы получали «РЕСАН» с пищей, 1 раз в день, в дозе 500 мг/кг, в течение 12 месяцев. Животные 10 группы получали «РЕСАН» с пищей, 1 раз в день, в дозе 5 г/кг, в течение 12 месяцев. Животные 11 группы не получали «РЕСАН» и служили контролем для животных 9-10 групп.

Через сутки после завершения введения вакцины у животных брали кровь и исследовали биохимические показатели.

Реакция общей анафилаксии (анафилактический шок). Исследования проводили на морских свинках, массой 250-276 г. В эксперименте было 3 группы животных. В каждой группе было по 20 животных (10 самцов и 10 самок). Первой группе животных вводили вакцину в терапевтической дозе (ТД1) – 3 мг вакцины на одно животное. Второй группе – на порядок выше (ТД10), т.е. 30 мг на одно животное. Контрольной группе вводили 0,5 мл 0,9% раствора хлорида натрия. Препарат вводили подкожно на 1, 3 и 5 дни. На 21 день животным делали разрешающее подкожное введение вакцины. Реакцию оценивали по следующей схеме:

- + кратковременное почёсывание носа, взъерошивание шерсти;
- + + чётко выраженные частые почёсывания носа, единичные чихания;
- + + + спастический кашель, боковое положение животного, отделение кала и мочи;
- + + + + спазм дыхательных путей, конвульсивные прыжки, судороги, смерть.

Непрямой тест дегрануляции тучных клеток (выявляли IgE-антитела к вакцине).

Исследования проводили на 3 группах крыс Wistar, массой 200-220 г. В каждой группе было по 20 животных (10 самцов и 10 самок). Первой группе животных вводили вакцину в дозе (ТД1) – 3 мг вакцины на одно животное. Второй группе – в дозе 30 мг на одно животное (ТД10). Контрольной группе – 0,5 мл 0,9% раствора хлорида натрия. Препарат вводили подкожно на 1, 3 и 5 дни. На 21 день животным делали разрешающее подкожное введение вакцины.

Тучные клетки получали от интактных мышей. Их умерщвляли и сразу внутрибрюшинно вводили 5 мл подогретого до 37°C 0,9% раствора NaCl, приготовленного на 0,15 М фосфатном буфере (рН 7,2); в течение 1-2 минут массировали брюшко. Вскрывали брюшную полость, предварительно отсепарировав кожу. Собирали промывную жидкость с тучными клетками в пробирку с гепарином (20 ЕД/мл). Отмытые перитонеальные тучные клетки ресуспензировали до $5 \cdot 10^7$ клеток/мл. В круглодонную лунку полистиролового иммунологического планшета вносили по 0,02 мл суспензии тучных клеток и 0,02 мл исследуемой сыворотки крыс инкубировали в течение 15 минут при 37°C. Затем вносили 0,02 мл вакцины, разведённой до 10^{-2} , и снова инкубировали в течение 15 минут при 37°C. После этого в лунку вносили 0,06 мл 0,025% раствора толуидинового синего, содержимое лунки осторожно перемешивали и вносили в камеру Горяева. Использовали 2 контроля: 1 контроль (тучные клетки + испытуемая сыворотка + физиологический раствор), 2 контроль (тучные клетки + сыворотка интактного животного + вакцина). В контрольных пробах считали 40 тучных клеток в больших квадратах камеры Горяева, затем в тех же квадратах камеры считали тучные клетки в опытных пробах.

Процент дегранулированных тучных клеток рассчитывали по формуле:

$$\text{ПДТК} = (\text{ТКк} - \text{ТКо}) : \text{ТКк} \cdot 100\%,$$

где ПДТК – процент дегранулированных тучных клеток; ТКк – число тучных клеток в контроле; ТКо – число тучных клеток в опыте. При дегрануляции 40% тучных клеток и более реакцию считали положительной.

Реакция иммунных комплексов. Двум группам морских свинок вакцину вводили подкожно, 5 раз, с интервалом 6 суток. Первой группе животных вводили вакцину в дозе (ТД1) – 3 мг вакцины на одно животное. Второй группе – в дозе 30 мг (ТД10) на одно жи-

вотное в объёме 0,3 мл. Контрольным животным по той же схеме и в том же объёме вводили растворитель – 0,9% NaCl. В каждой группе было по 20 животных (10 самцов и 10 самок). Через 10 суток после последней сенсibilизирующей инъекции вакцины проводили введение разрешающей дозы вакцины, 100 мг в 0,5 мл 0,9% NaCl, которую вводили внутривенно, в область выстриженного участка кожи (2x2 см) боковой поверхности морской свинки. На таком же участке кожи противоположной стороны этим же животным вводили 0,5 мл 0,9% NaCl для контроля реактивности кожи.

Учёт реакции проводили визуально (через 30 минут, а далее – 1 раз в сутки в течение 10 дней) и гистологически.

0 – видимой реакции нет;

1 – бледно-розовая эритема по всему участку или по его периферии;

2 – ярко-розовая эритема по всему участку или по его периферии;

3 – красная эритема по всему участку;

4 – инфильтрация и отёк кожи при наличии или отсутствии эритемы;

5 – эритема, выраженная инфильтрация, очаговое изъязвление (некроз), возможны геморрагии, образование корочек.

Местное раздражающее действие (метод накожной аппликации)

Эксперимент проводили на крысах и морских свинках, в каждой группе было по 20 опытных и 20 контрольных животных.

На выстриженный участок кожи (2x2 см) боковой поверхности животного наносили по 3 капли раствора вакцины на 0,9% NaCl (100 и 300 мг в 1 мл). Вакцину наносили на протяжении 2 недель, по 5 раз в неделю. Реакцию кожи учитывали в баллах по шкале оценки кожных проб, через 5, 30 минут и 24 часа. Животным контрольной группы наносили по 3 капли 0,9% раствора NaCl.

0 – видимой реакции нет;

1 – бледно-розовая эритема по всему участку или по его периферии;

2 – ярко-розовая эритема по всему участку или по его периферии;

3 – красная эритема по всему участку;

4 – инфильтрация и отёк кожи при наличии или отсутствии эритемы;

5 – эритема, выраженная инфильтрация, очаговое изъязвление (некроз), возможны геморрагии.

Цитотоксичность (реакция повреждения лейкоцитов)

Цитотоксическое действие вакцины оценивали на клетках крови доноров. Реакция повреждения лейкоцитов оценивалась по окраске мертвых клеток раствором трипанового синего. Из гепаринизированной крови доноров готовили лейкосуспензию 2×10^6 клеток/мл. К 0,1 мл лейкосуспензии добавляли 0,1 мл раствора вакцины в разной концентрации (1 г/л, 10 г/л и 100 г/л), а в контроль добавляли 0,1 мл 0,9% NaCl. Смесь инкубировали 30 минут при $+37^\circ\text{C}$. Затем к смеси добавляли 0,1 мл 0,1% раствора трипанового синего. Подсчитывали в камере Горяева процент окрашенных (погибших) клеток. Исследование проведено на 20 образцах крови доноров. Все пробы дублировали.

Результаты и обсуждение

Первые исследования специфической активности РЕСАНа, проведенные на лимфосаркоме Плисса, показали, что к 14 суткам после трансплантации опухоли у 7 из 14 животных первой группы опухоль стала уменьшаться в размерах, во второй группе опухоль стала уменьшаться у 4 животных из 14. У животных контрольной группы уменьшения размера опухоли не наблюдали. Все животные были подвергнуты эвтаназии. Из опухолей животных контрольной группы и регрессирующих опухолей животных опытных групп были сделаны гистологические препараты.

При микроскопии контрольных препаратов была обнаружена прогрессирующая лимфосаркома. Среди её клеток большое число митозов и клеток, определённых как бласты (лимфобласты). Эти клетки имели большие размеры, слабо базофильную цитоплазму, крупное ядро. В ядре определя-

лись 1-2 ядрышка и гетерохроматин в виде нежной сеточки. Дифференцированных малых лимфоцитов было мало. Встречались лимфоциты средних размеров. Много разрушенных клеток.

При микроскопии опытных препаратов встречались единичные опухолевые узлы небольших размеров. Такие узлы интенсивно прорастали соединительной тканью. Среди клеток этих узлов отсутствовали бласты, а основными клетками являлись малые лимфоциты и, в меньшей степени, средние лимфоциты.

Из результатов микроскопии можно предположить, что регрессия лимфосаркомы может быть вызвана действием на опухолевые клетки малых и средних лимфоцитов.

После получения этих результатов было принято решение проверить действие вакцины «РЕСАН» на другие перевивные опухоли.

Альвеолярный рак печени РС-1

Для определения количества опухолевых клеток, которое система иммунитета крысы может уничтожить самостоятельно, был поставлен эксперимент на 12 животных. В каждой группе было по 3 животных, которым трансплантировали по 0,4 мл 10-0,001% взвеси опухолевых клеток. Результаты этого эксперимента приведены в таблице 1.

У всех животных 1-3 групп развился альвеолярный рак печени РС-1, а у крыс 4 группы опухоль не развилась.

Из этого эксперимента можно сделать заключение, что система иммунитета здоровой крысы самостоятельно может уничтожить лишь небольшое количество опухолевых клеток, которое содержится в 0,4 мл 0,01% взвеси РС-1.

При проведении профилактической противоопухолевой вакцинации были получены

Таблица 1

Рост альвеолярного рака печени РС-1 у крыс (средние размеры опухоли в см³)

Сутки после трансплантации 0,4 мл взвеси опухоли	Группа №1 10%	Группа №2 1%	Группа №3 0,1%	Группа №4 0,01%
13	0,001	0,000	0,000	0,000
21	0,992	0,100	0,000	0,000
27	2,945	0,604	0,002	0,000
41	5,826	3,416	0,115	0,000
55			1,415	0,000
69				0,000

результаты, подтверждающие общепризнанное мнение – чем меньше опухоль, тем легче системе иммунитета её уничтожить. В одном эксперименте участвовало 20 животных (10 опытных и 10 контрольных), за 22 дня до трансплантации 0,4 мл 10% взвеси клеток РС-1 опытным животным однократно подкожно вводили 33 мг вакцины. В этом эксперименте было излечено 10% опытных животных, торможение роста РС-1 в опытной группе на 20 сутки составило 61%, на 27 сутки – 42%. В другом эксперименте участвовало 40 животных (20 опытных и 20 контрольных), за 22 дня до трансплантации 0,4 мл 5% взвеси клеток РС-1 опытным животным однократно подкожно вводили 33 мг вакцины. В этом эксперименте было излечено 30% опытных животных. Результаты этих экспериментов приведены в таблицах 2 и 3.

Гепатома 27

В эксперименте с 34 животными (12 вакцинация, 12 терапия и 10 контрольных) ни профилактическая вакцинация, ни терапия вакциной РЕСАН не повлияли на рост гепатомы 27. У животных опытных групп опухоль росла так же, как и в контроле. Все животные с гепатомой 27 погибли. Предполагаем, что в вакцине РЕСАН отсутствуют имитаторы, сходные с поверхностными антигенами этой перевивной опухоли, чем и объясняется отсутствие специфического противоопухолевого иммунного ответа.

Этот эксперимент был повторён на удвоенном количестве животных каждой группы. Результаты были аналогичны предыдущему эксперименту. Введение вакцины не оказывало влияние на рост гепатомы 27.

Саркома-45

В эксперименте участвовало 36 животных (18 опытных и 18 контрольных). Опытным животным вакцину РЕСАН вводили однократно подкожно в дозе 30 мг. Через 33 дня

всем животным трансплантировали 0,5 мл 10% взвеси клеток саркомы-45 под кожу паховой области. В данном эксперименте было излечено 33% животных в опытной группе, в контрольной группе все животные погибли.

В другом эксперименте с 49 животными (20 опытных и 19 контрольных) опытным животным вакцину РЕСАН вводили однократно подкожно в дозе 30 мг. Через 33 дня всем животным трансплантировали 0,2 мл 5% взвеси клеток саркомы-45 под кожу паховой области. В данном эксперименте было излечено 60% животных в опытной группе, в контрольной группе все животные погибли, у одного животного опухоль не привилась.

Результаты этих экспериментов приведены в таблицах 4 и 5.

Карциносаркома Уокер-256

Скорость роста перевивной опухоли умеренно зависела от места трансплантации на теле животного. При трансплантации опухоли под кожу наружной поверхности бедра рост опухоли шёл несколько медленнее, чем при трансплантации под кожу паховой области.

Эффективность применения вакцины зависела от кратности её введения. Это было установлено в эксперименте на 120 животных, групп Вакцинации-3, Вакцинации-6, Терапии-3, Терапии-7, Терапии-15. Результаты этого эксперимента представлены в таблицах 6 и 7.

Чем меньше размер опухоли, и чем раньше ответ системы иммунитета, тем лучше результаты лечения. Введение вакцины в течение 1-3 дней подряд создавало наиболее оптимальный противоопухолевый иммунный ответ.

Если сравнивать вакцинацию и иммунотерапию, то при всех чувствительных к вакцине РЕСАН опухолях процент излеченных животных при вакцинации был выше, чем при иммунотерапии.

Таблица 2

Рост альвеолярного рака печени РС-1 (средние размеры опухоли в см³, M±m)

Сутки после трансплантации опухоли	Группы	
	Контроль	Вакцинация за 22 дня до трансплантации 0,4 мл 10% взвеси клеток РС-1
20	1,28±0,23	0,49±0,09*
27	4,51±1,13	2,63±0,82
34	4,27±0,77	3,44±0,57

Примечание: * – достоверное различие с контролем, p<0,05

Таблица 3**Рост альвеолярного рака печени РС-1 (средние размеры опухоли в см³, M±m)**

Сутки после трансплантации опухоли	Группы	
	Контроль	Вакцинация за 22 дня до трансплантации 0,4 мл 5% взвеси клеток РС-1
20	0,94±0,11	0,31±0,05*
27	4,46±0,76	1,83±0,43*
34	4,73±0,65	2,36±0,53*

Примечания. * – достоверное различие с контролем, p<0,05.
При расчёте p использовали двухвыборочный t-тест Стьюдента

Таблица 4**Рост саркомы-45 (средние размеры опухоли в см³, M±m)**

Сутки после трансплантации опухоли	Группы	
	Контроль	Вакцинация за 33 дня до трансплантации 0,5 мл 10% взвеси клеток S-45
13	1,04±0,14	0,44±0,12*
20	2,41±0,76	0,95±0,18*
28	5,78±0,66	2,42±0,44*

Примечание. * – достоверное различие с контролем, p<0,05

Таблица 5**Рост саркомы 45 (средние размеры опухоли в см³, M±m)**

Сутки после трансплантации опухоли	Группы	
	Контроль	Вакцинация за 22 дня до трансплантации 0,5 мл 5% взвеси клеток РС-1
13	0,55±0,1	0,2±0,04*
20	1,79±0,18	0,47±0,12*
28	5,13±0,66	1,16±0,32*

Примечание. * – достоверное различие с контролем, p<0,05

Таблица 6**Влияние кратности введения вакцины на рост карциносаркомы Уокер-256 (средние размеры опухоли в см³, M±m)**

Сутки после трансплантации опухоли	Группы					
	Контроль	Вакцинации-3	Вакцинации-6	Терапии-3	Терапии-7	Терапии-15
7	1,48±0,25	0,49±0,05*	0,95±0,14	0,99±0,13	1,6±0,16	1,34±0,11
10	5,07±1,1	1,29±0,11*	2,2±0,2*	3,71±0,53	6,19±0,78	6,6±0,61
13	9,55±1,43	2,52±0,59*	5,88±1,02*	7,16±1,07	10,63±1,04	15,79±1,36
16	17,14±2,24	4,23±1,17*	8,59±1,82*	10,63±1,72	14,91±1,76	21,57±2,48
19	20,67±2,37	6,42±1,85*	12,44±2,71*	17,08±3,18	22,81±2,96	28,51±4,11

Примечание. * – достоверное различие с контролем, p<0,05

Таблица 7**Влияние кратности введения вакцины на процент излеченных животных от карциносаркомы Уокер-256**

Группы	Контроль	Вакцинации-3	Вакцинации-6	Терапии-3	Терапии-7	Терапии-15
% излеченных животных	0	50*	35*	35*	25*	10

Примечание. * – достоверное различие с контролем, p<0,05

На рисунке 1 показано, каких средних размеров достигала опухоль у излеченных животных при вакцинации и терапии. После вакцинации сила иммунного ответа выше. Опухоль уничтожается на ранней стадии своего развития, и поэтому не достигает таких больших размеров, как при иммунотерапии. В контроле опухоль прогрессивно растёт, приводя животных к неминуемой гибели (Рис.2).

Неоднократно проводили эксперименты по повторному привитию перевивной опухоли излеченным при помощи вакцины РЕСАН животным. Излеченным от карциносаркомы Уокер-256 животным пересаживали повторно

или карциносаркому Уокер-256, или саркому-45, или гепатому 27. В этих экспериментах процент излеченных животных всегда был в интервале от 50 до 60%. При перевивке излеченным при помощи РЕСАНа от карциносаркомы Уокер-256 животным гепатомы 27 все животные погибали.

При анализе результатов применения вакцины РЕСАН (полученных нами и в Научно-исследовательском институте онкологии и медицинской радиологии Министерства Здравоохранения Республики Беларусь) была установлена зависимость эффективности вакцинации от скорости роста карциносаркомы Уокер-256 (Рис.3).



Рис. 1. Изменение объема карциносаркомы Уокер-256 у излеченных животных

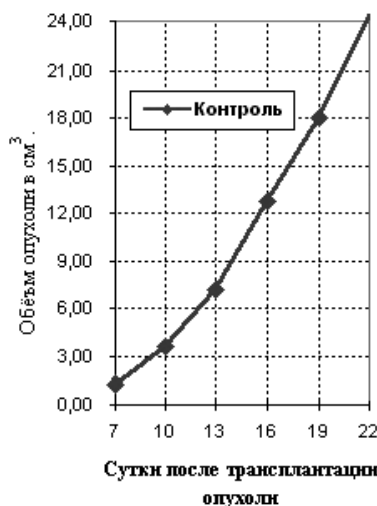


Рис. 2. Изменение объема карциносаркомы Уокер-256

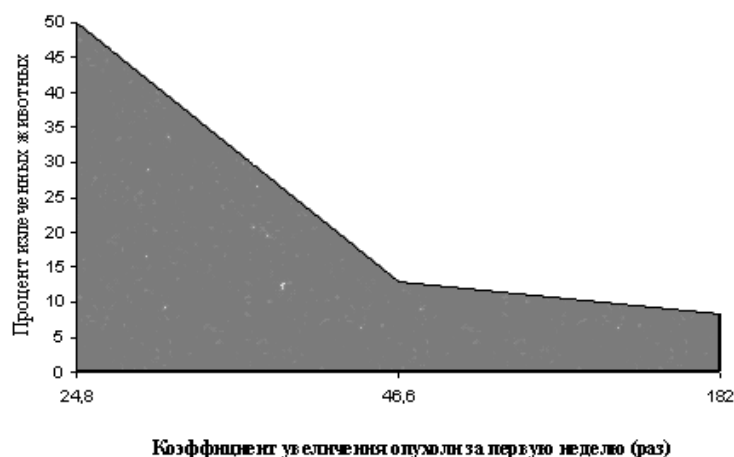


Рис. 3. Эффективность однократной вакцинации в зависимости от митотической активности карциносаркомы Уокер-256

Эксперимент с саркомой-45 на 28 животных (14 опытных и 14 контрольных) по внутриопухолевому введению вакцины показал, что такой способ введения вакцины не стимулировал противоопухолевый иммунный ответ, и опухоль продолжала расти, как и в контроле.

Внутрикожное, подкожное и внутримышечное введение имитаторов опухолевых антигенов способствовало включению противоопухолевого иммунитета и приводило к полному уничтожению злокачественной опухоли, если скорость образования противоопухолевых иммунокомпетентных клеток превосходила скорость деления опухолевых клеток.

После полного уничтожения опухоли системой иммунитета рецидивов не было. Мы предполагаем, что это результат формирования противоопухолевой иммунологической памяти.

Эффективная доза вакцины РЕСАН находилась в интервале 48-1400 мг/кг массы крысы. Коэффициент видовой стойкости позволяет экстраполировать данные, полученные у животных, на человека. Коэффициент видовой стойкости у крысы (КВСк) – 1,89. Коэффициент видовой стойкости у человека (КВСч) – 0,45. Поправочный коэффициент, позволяющий установить предполагаемую для человека дозу рассчитывали следующим способом: $KBCч / KBCс$, т.е. $0,45 / 1,89 = 0,238$.

Таким образом, начальная ориентировочная доза вакцины, предполагаемая для I и II фазы клинических испытаний, должна быть 11,5 мг/кг. Для среднего человека массой 70 кг доза составляет 800 мг.

Влияние вакцины РЕСАН на основные функции лабораторных животных.

Влияние вакцины на температуру тела кроликов отражено в таблице 8. В каждой группе было по 10 самцов и самок. Контрольные кролики вакцину не получали, вместо неё им вводили растворитель вакцины – физиологический раствор.

Вакцина РЕСАН не оказывала влияния на терморегуляторную функцию кроликов при подкожном введении в дозах 10 и 100 мг на 1 кг массы тела в течение 5 часового периода наблюдений.

Влияние подкожного введения вакцины на поведение животных изучали в тесте «открытое поле» на белых 150 крысах (по 25 самцов и 25 самок в каждой группе) в возрасте 3,5 месяцев. Результаты отражены в таблице 9.

При подкожном введении в дозе 10 и 100 мг на кг массы животного вакцина РЕСАН не оказывала влияния на поведение крыс.

Влияние вакцины на белковый, углеводный, жировой и минеральный обмен У одной крысы из группы 2, получавшей вакцину в дозе 500 мг/кг подкожно, в месте введения препарата на 10 суток развился феномен Артюса. У этого же животного при исследовании биохимических показателей крови после 30 дней введения вакцины было отмечено повышение мочевины до 8,6 мМ/л. У других крыс, получавших вакцину подкожно и перорально, никаких нарушений обнаружено не было.

Средние биохимические показатели крови крыс, получавших вакцину в течение 1 месяца, отражены в таблице 10.

Таблица 8
Влияние вакцины РЕСАН на терморегуляторную функцию кроликов (M±m)

Группы и количество животных	до введения	Температура °С через				
		1 час	2 часа	3 часа	4 часа	5 часов
10 мг на 1 кг n=20	38,87±0,105	38,93±0,1	38,9±0,107	38,96±0,097	38,88±0,107	39,06±0,106
100 мг на 1 кг n=20	38,75±0,101	38,76±0,094	38,82±0,102	38,90±0,113	38,82±0,113	38,82±0,106
Контроль n=20	38,87±0,084	38,9±0,104	38,9±0,096	38,93±0,112	38,88±0,104	39,0±0,105

Примечание. Различия между контрольной и опытными группами статистически недостоверны, $p > 0,05$

Таблица 9
Влияние вакцины РЕСАН на поведение крыс (M±m)

Группы и количество животных	Число пересечённых квадратов	Число вертикальных стоек	Число заглядываний в отверстия	Груминг	Дефекация
Контроль (n=50)	20,14±0,643	3,98±0,215	2,9±0,21	1,66±0,163	2,5±0,157
10 мг на 1 кг (n=50)	19,74±0,615	3,9±0,2	2,58±0,185	1,3±0,167	2,54±0,172
100мг на 1 кг (n=50)	19,16±0,655	4,06±0,205	3,14±0,214	1,36±0,168	2,2±0,162

Примечание. Различия в поведении животных между контрольной и опытными группами животных были статистически недостоверны, $p > 0,05$

Таблица 10
Средние биохимические показатели крови крыс, получавших вакцину в течение 1 месяца (M±m)

Показатель	Группы с введением вакцины				Контроль, группа 5, n=24
	1 группа, n=24 (подкожно, 1 раз в день, в дозе 50 мг/кг)	2 группа, n=24 (подкожно, 1 раз в день, в дозе 500 мг/кг)	3 группа, n=26 (с пищей, 1 раз в день, в дозе 500 мг/кг)	4 группа, n=26 (с пищей, 1 раз в день, в дозе 5 г/кг)	
Общий белок, г/л	68,34±1,6	65,67±1,67	67,03±1,49	67,2±1,52	66,14±1,57
Глюкоза, мМ/л	6,04±0,09	6,04±0,1	5,98±0,12	6,18±0,1	5,99±0,11
Билирубин общий, мкМ/л	13,93±0,69	13,04±0,71	12,95±0,64	11,63±0,58	13,73±0,7
Щелочная фосфатаза, мкМ/л/ч	4,94±0,1	4,98±0,1	4,79±0,11	5,09±0,12	4,82±0,13
АлАТ, мккат/л	1,19±0,02	1,17±0,03	1,16±0,02	1,19±0,02	1,25±0,02
АсАТ, мккат/л	0,44±0,01	0,45±0,01	0,43±0,01	0,46±0,01	0,47±0,01
Холестерин, мМ/л	2,19±0,17	2,52±0,14	2,46±0,14	2,38±0,17	2,57±0,17
Мочевина, мМ/л	6,7±0,18	6,94±0,19	6,87±0,2	7,06±0,17	7,29±0,17
Натрий, мМ/л	145,67±0,89	146,04±0,94	145,27±0,85	146,19±0,81	144,54±0,94
Калий, мМ/л	5,5±0,23	5,9±0,21	5,53±0,16	5,76±0,2	5,65±0,23
Кальций, мМ/л	2,5±0,04	2,52±0,04	2,44±0,04	2,44±0,04	2,52±0,03

Примечание. У животных, получавших РЕСАН в течение 1 месяца, биохимические анализы крови не имели статистически достоверных различий с контролем, $p > 0,05$.

Вакцина РЕСАН не влияла на биохимические показатели крови крыс, получавших ее с пищей в течение 6 месяцев. Средние биохимические показатели крови крыс, получавших вакцину в течение 6 месяцев, отражены в таблице 11.

Вакцина РЕСАН не влияла на биохимические показатели крови крыс, получавших ее с пищей в течение 12 месяцев. Средние биохимические показатели крови крыс, получавших вакцину в течение 12 месяцев, отражены в таблице 12.

Таблица 11**Средние биохимические показатели крови крыс, получавших вакцину в течение 6 месяцев (M±m)**

Показатель	Группы с введением вакцины		Контроль, группа 8, n=24
	6 группа, n=22 (с пищей, 1 раз в день, в дозе 500 мг/кг, в течение 6 мес.)	7 группа, n=22 (с пищей, 1 раз в день, в дозе 5 г/кг, в течение 6 мес.)	
Общий белок, г/л	61,13±1,67	67,18±1,79	66,33±1,68
Глюкоза, мм/л	5,99±0,12	6,14±0,11	6,08±0,11
Билирубин общий, мкМ/л	12,1±0,76	13,32±0,75	12,5±0,73
Щелочная фосфатаза, мкМ/л/ч	4,92±0,1	5,23±0,12	4,94±0,11
АлАТ, мккат/л	1,22±0,02	1,17±0,03	1,16±0,02
АсАТ, мккат/л	0,45±0,01	0,44±0,01	0,46±0,01
Холестерин, мм/л	2,41±0,15	2,35±0,19	2,52±0,16
Мочевина, мм/л	6,75±0,16	6,69±0,17	6,81±0,18
Натрий, мм/л	144,18±0,76	144,54±0,75	146,13±0,87
Калий, мм/л	5,62±0,2	5,5±0,2	5,77±0,2
Кальций, мм/л	2,46±0,04	2,52±0,04	2,49±0,03

Примечание. У животных, получавших вакцину РЕСАН в течение 6 месяцев, биохимические анализы крови не имели статистически достоверных различий с контролем, $p>0,05$

Таблица 12**Средние биохимические показатели крови крыс, получавших вакцину в течение 12 месяцев (M±m)**

Показатель	Группы с введением вакцины		Контроль, группа 11, n=24
	9 группа, n=24 (с пищей, 1 раз в день, в дозе 500 мг/кг, в течение 12 мес.)	10 группа, n=24 (с пищей, 1 раз в день, в дозе 5 г/кг, в течение 12 мес.)	
Общий белок, г/л	63,8±1,66	65,15±1,58	67,88±1,49
Глюкоза, мм/л	6,1±0,11	6,08±0,09	6,19±0,09
Билирубин общий, мкМ/л	12,74±0,76	13,47±0,69	12,82±0,74
Щелочная фосфатаза, мкМ/л/ч	4,99±0,12	4,77±0,1	4,89±0,11
АлАТ, мккат/л	1,21±0,02	1,17±0,02	1,22±0,02
АсАТ, мккат/л	0,46±0,01	0,45±0,01	0,43±0,01
Холестерин, мм/л	2,65±0,18	2,72±0,16	2,62±0,15
Мочевина, мм/л	7,04±0,16	6,99±0,19	6,77±0,16
Натрий, мм/л	143,42±0,8	145,7±0,85	144,29±0,72
Калий, мм/л	5,33±0,19	5,9±0,19	5,75±0,18
Кальций, мм/л	2,55±0,04	2,5±0,04	2,47±0,04

Примечание. У животных, получавших вакцину РЕСАН в течение 12 месяцев, биохимические анализы крови не имели статистически достоверных различий с контролем, $p>0,05$

Реакция кожной анафилаксии

При проведении реакции кожной анафилаксии на морских свинках установлено, что вакцина РЕСАН вызывает реакцию у 40% опытных животных из группы ТД10 и у 35% животных группы ТД1.

В группе ТД10 у 25% опытных животных реакция оценивалась в +, у 15% в ++.

В группе ТД1 у 25% опытных животных реакция оценивалась в +, у 10% в ++. Наблюдаемый эффект в этом тесте оценили как проявление индивидуальной чувствительности.

Непрямой тест дегрануляции тучных клеток не выявил у крыс появления IgE-зависимой дегрануляции базофилов после применения вакцины. В группе ТД1 - 3 мг (n=20) количество недегранулированных базофилов было $32,3 \pm 0,72$ ($M \pm m$), а в группе ТД10 - 30 мг (n=20) количество недегранулированных базофилов было $30,8 \pm 0,71$ ($M \pm m$). Ни у одного животного процент дегранулированных тучных клеток не вышел за границу 40%. Максимальный процент дегранулированных тучных клеток был у самца №10 - 37,5%, получавшего вакцину в дозе 30 мг.

Реакция иммунных комплексов различной степени выраженности обнаружена у животных после применения вакцины РЕСАН. В группе животных, получавших вакцину в дозе 3 мг на животное, реакция в 0 баллов была у 45% животных, у 30% животных реакцию оценили в 1 балл, у 25% животных реакцию оценили в 2 балла. В группе животных, получавших вакцину в дозе 30 мг на животное, реакция в 0 баллов наблюдалась у 35% животных, у 35% животных реакцию оценили в 1 балл, у 20% животных реакцию оценили в 2 балла, у 5% животных реакцию оценили в 3 балла и у 5% животных реакцию оценили в 4 балла. В контрольной группе у 95% животных реакцию оценили в 0 баллов и у 5% животных - в 1 балл.

У животных с реакцией 4 балла провели гистологическое исследование кожи. В инфилт-

рированном участке обнаружены полиморфно-ядерные лейкоциты.

Местное раздражающее действие

Эксперимент проведен на крысах и морских свинках с использованием метода накожной аппликации. Местное нанесение по 3 капли раствора вакцины на 0,9% NaCl (100 и 300 мг в 1 мл) не вызвало раздражения кожи ни у одного опытного животного. РЕСАН не оказывал местного раздражающего действия на кожу крыс и морских свинок.

Цитотоксичность

Исследование провели на 20 образцах крови доноров. Все пробы дублировали. Вакцина РЕСАН не оказывала прямого цитотоксического действия на клетки крови человека в концентрации 1 г/л, 10 г/л и 100 г/л.

Результаты приведены в таблице 13.

Выводы

Специфическая активность

Доклинические исследования на животных-опухоленосителях показали, что вакцина РЕСАН усиливает специфический противоопухолевый ответ системы иммунитета крыс против ряда перевивных опухолей (лимфосаркомы Плисса, карциносаркомы Уокер-256, саркомы-45, альвеолярного рака печени РС-1).

Система иммунитета крысы с помощью вакцины способна уничтожить саркому-45 объемом около 1 см^3 , ($\text{max}-3 \text{ см}^3$), карциносаркому Уокер-256 объемом около 9 см^3 , ($\text{max}-35 \text{ см}^3$). Кроме этого, применение вакцины увеличивало среднюю продолжительность жизни павших животных.

Введение вакцины РЕСАН не влияло на рост гепатомы 27.

Эффективность вакцины РЕСАН зависела от гистологической структуры опухоли.

При сравнении результатов профилактической РЕСАН-вакцинации и РЕСАН-терапии количество излеченных животных и торможение

Таблица 13

Процент погибших клеток донора ($M \pm m$)

Серия проб	Дозы вакцины			
	1 г/л	10 г/л	100 г/л	контроль
основные пробы	$4,75 \pm 0,45$	$5,8 \pm 0,43$	$5,65 \pm 0,41$	$5,7 \pm 0,46$
дубли проб	$5,15 \pm 0,45$	$5,55 \pm 0,47$	$5,3 \pm 0,49$	$5,35 \pm 0,46$

Примечание. Статистические различия между пробами отсутствовали.

роста опухоли было выше в группах вакцинации. Иммунологическая защита эффективна при микроопухолях, поэтому наиболее целесообразно применять препарат для вакцинации. В этом случае противоопухолевый иммунный ответ развивался раньше, что позволяло уничтожить опухоль на ранних стадиях её развития.

Эффективная доза вакцины РЕСАН находилась в интервале 48-1400 мг/кг массы крысы. С учётом коэффициента видовой стойкости начальная ориентировочная доза вакцины, предполагаемая для I и II фазы клинических испытаний, составляет 11,5 мг/кг. Для среднего человека массой 70 кг это 800 мг.

Влияние вакцины на основные функции

Вакцина РЕСАН не оказывала влияния на терморегуляторную функцию кроликов при подкожном введении в дозах 10 и 100 мг на 1 кг массы тела в течение 5 часового периода наблюдений.

Подкожное введение вакцины РЕСАН в дозе 10 и 100 мг на кг массы животного не оказывало влияния на поведение крыс.

Вакцина РЕСАН не оказывала влияния на биохимические показатели (общий белок, глюкоза, общий билирубин, щелочная фосфатаза, АЛТ, АсАТ, холестерин, мочевины, натрий, калий, кальций) крыс, получавших её подкожно 1 раз в день в дозе 50 мг/кг, в течение 1 месяца; не оказывала влияния на биохимические показатели крыс, получавших её подкожно 1 раз в день в дозе 500 мг/кг, в течение 1 месяца, за исключением одного животного, у которого уровень мочевины повысился до 8,6 мМ/л; не оказывала влияния на биохимические показатели крыс, получавших его с пищей 1 раз в день в дозе 500 мг/кг и 5 г/кг, в течение 1,6 и 12 месяцев.

При проведении реакции кожной анафилактики на морских свинках отмечено развитие реакции гиперчувствительности I типа легкой степени тяжести.

У крыс, получавших вакцину, в тесте дегрануляции тучных клеток IgE-зависимые реакции на введение вакцины отсутствовали.

У крыс, получавших вакцину в дозе 3 мг (ТД1), выявлены лёгкие иммунокомплексные реакции. У крыс, получавших вакцину в дозе 30 мг (ТД10), помимо лёгких иммунокомплексных реакций у 10% животных выявлены иммунокомплексные реакции средней степени тяжести.

Вакцина РЕСАН не вызывала местного раздражающего действия при нанесении на кожу крыс и морских свинок в дозах 100 и 300 мг/мл; не оказывала токсического действия на экспериментальных животных и клетки крови человека.

Представленные в этой статье результаты являются частью полного доклинического исследования вакцины РЕСАН.

Заключение

Комиссия по медицинским иммунобиологическим препаратам Министерства здравоохранения Республики Беларусь рассмотрела заключения экспертов по доклиническим исследованиям вакцины РЕСАН и решила: учитывая положительные заключения экспертов, комиссия считает возможным назначение Фармакологическим комитетом Министерства здравоохранения Республики Беларусь 1-ой фазы клинических испытаний указанного медицинского иммунобиологического препарата (Протокол №8 от 17.02.2005г.).

Литература

1. Description of Systems Used in Experimental Screening of Anti-Cancer Preparations in Sixteen Countries, 1974
2. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США. Под редакцией З.П.Софьиной, А.Б.Сыркина (СССР), А.Голдина, А.Кляйна (США), Москва, «Медицина», 1980.
3. Исследование раздражающего и сенсибилизирующего действия ISO 10993-10:1995
4. Исследование токсичности in vitro ISO 10993-5:1999
5. Исследование токсичности ISO 10993-11:1993
6. Новиков Д.К., Новикова В.И. Оценка иммунного статуса. -М.-Витебск, 1996.-282с