



Д.И.Ивановский

Федеральное государственное бюджетное учреждение

**«Научно-исследовательский институт
вирусологии им. Д.И. Ивановского»**

Министерства здравоохранения и социального развития
Российской Федерации

123098, Москва, ул. Гамалеи, 16

ОКПО 01897334

ИНН/КПП 7734008550/773401001

Телефон: (499) 190-28-74

Факс: (499) 190-28-67

www.virology.ru

№ _____

На № _____

от _____



Утверждаю:

Директор ФГУ НИИ вирусологии

им. Д.И.Ивановского Минсоцздравразвития РФ

Академик РАН

Д.К.Львов

2011 г

**«Исследование влияния препаратов производных 1,3-
диэтилбензимидазолия на показатели иммунной системы
экспериментальных животных».**

(Отчет)

Ответственный исполнитель:
Ведущий научный сотрудник
Кандидат биологических наук

Исаева Е.И.

Москва, 2011 г

Препарат «Стелланин капли для местного применения и приема внутрь 40 мг/кг» зарегистрирован в качестве антисептического средства при инфекциях рото-глотки. В то же время, эффективность препарата превосходит имеющиеся аналоги с подобным антисептическим действием, что позволяет предположить наличие у Стелланина дополнительных терапевтических свойств. В этой связи было изучено влияние на иммунную систему Стелланина (1,3-диэтилбензимидазолия трийодида), а также его физиологического метаболита 1,3-диэтилбензимидазолия йодида в сравнении с современным иммуностимулирующим препаратом Глутоксимом.

Общая информация.

Исследование проводилось в лаборатории иммунологии НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского Минсоцразвития РФ.

Цели и задачи.

Изучение противовирусной и иммуностимулирующей активности препарата «Стелланин» (активная субстанция – 1,3-диэтилбензимидазолия трийодид), его метаболита 1,3-диэтилбензимидазолия йодида в сравнении с препаратом «Глутоксим» - бис-(гамма-L-глутамил)-L-цистеинил-бис-глицин динатриевая соль) при экспериментальной инфекции мышей, индуцированной вирусом гриппа А.

Материалы и методы:

Оценка активности. Оценка противовирусной активности препаратов «Стелланин», 1,3-диэтилбензимидазолия йодида и препарата сравнения «Глутоксим» осуществлена в соответствии с требованиями Фармакологического государственного комитета РФ (2005).

Вирус. Для проведения исследований был *in vivo* использован вирус гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) предварительно адаптированный к размножению в легких мышей в дозе 100 LD₅₀. Инфекционная активность вируса определена по методу Рида и Менча при заражении мышей десятикратными разведениями суспензии легких.

Специфичность вирусного поражения контролировали путем постановки реакции гемагглютинации и методом пассажа в куриных эмбрионах вирусной суспензии легких зараженных вирусом A/Aichi/2/68 мышей. В ходе опытов проводили типирование вируса с моноспецифической сывороткой для исключения возможной контаминации другими вирусными агентами.

О способности препарата оказывать лечебный эффект судили по гибели инфицированных адаптированным вирусом гриппа мышей опытной группы в сравнении с группой животных, не получавших препарат.

Заражение животных. Беспородных белых мышей весом 12-14 г заражали вирусом интраназально под легким эфирным наркозом в объеме 0,05 мл/мышь.

Работу с мышами проводили согласно инструкциям по работе с лабораторными животными. Перед исследованием животных подвергали 5-дневному карантину.

Животные получали стандартный рацион питания и содержались в равноценных условиях.

Схема проведения исследования.

Изучение защитной активности препарата проведено согласно методическим рекомендациям по испытаниям и оценке противовирусного действия препаратов в отношении вирусов гриппа.

Препараты Стелланин и 1,3-диэтилбензимидазолия йодид вводили перорально дважды в течение одного дня по 0,025 мл в дозах 1,3-диэтилбензимидазолия трийодида 40 мг/кг и 1,3-диэтилбензимидазолия йодида 20 мг/кг, а также внутривентрально Глутоксим дважды в дозе 10 мг/кг по следующим схемам:

- за 24 часа до инфицирования мышей вирусом гриппа,
- через 24 часа после инфицирования животных.

Кроме того, препараты Стелланин и Глутоксим вводили хронически в течение 8 дней, начиная курс за 24 часа до инфицирования мышей вирусом гриппа. В первый день препараты вводили двукратно. Использовали дозы Стелланина 5, 10, 20 и 40 мг/кг перорально и Глутоксима – 10 мг/кг внутривентрально.

Мышам контрольной группы вируса вводили в тех же условиях физраствор.

Для изучения влияния препаратов на показатели иммунной системы препараты вводили также по тем же схемам, но без заражения животных вирусом гриппа.

Для изучения противовирусной активности препарата использовали заражающую дозу вируса, вызывающую 60-70% летальности у мышей. Инфицирующая доза вируса и испытываемая концентрация препарата проверялись не менее чем на 10 мышах. За животными наблюдали в течение 20 дней после

заражения, учитывая гибель мышей от гриппа в группах леченых животных и контроле (мышь, не получавшие препараты).

Учет результатов опытов проводили по показателям выживаемости в группе леченых по отношению к контрольной, индексу защиты, средней гармонической величине времени жизни мышей.

Индекс защиты рассчитывали по формуле: $[(1 - A)/A] \times 100$, где $A = K_{\text{в}} / K_{\text{оп}}$,

$K_{\text{в}}$ – процент гибели животных в контроле (мышь, зараженные вирусом), $K_{\text{оп}}$ – процент гибели в опытной группе мышей (вирус и препарат).

Цифровой материал подвергался статистической обработке, позволяющей объективно оценить количественные результаты продолжительности жизни опытных и контрольных животных, рассчитанной по медико-статистической модели, соответствующей распределению Пуассона с поправкой С. Гарда (Дж. Мейнелл и Э. Мейнелл, 1970).

Характеристику иммунного статуса осуществляли с помощью комплекса методов, позволяющих оценить как клеточные, так и гуморальные звенья иммунной системы.

Рассчитывали средние значения по каждой группе животных со среднестатистическим отклонением в системе Microsoft Excel.

Цифровой материал подвергался статистической обработке с использованием метода Стьюдента.

Общепринятыми гематологическими методами определяли общее содержание лейкоцитов, а также относительное и абсолютное количество лимфоцитов в периферической крови.

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови изучали на клетках, выделенных на градиенте плотности фиколл-верографин методом непрямой иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител к дифференцировочным антигенам лимфоцитов фирмы "ДиагноТех" (Москва, ОНЦ) и «Сорбент» (Москва). В качестве вторых антител служили козы антигены против иммуноглобулинов кролика, меченные FITC, производства НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Е.Ф. Гамалеи (Москва). Исследовали следующие субпопуляции иммунокомпетентных клеток: CD3⁺ (зрелые Т-лимфоциты), CD4⁺ (Т-хелперы/индукторы), CD8⁺ (Т-киллеры/супрессоры), CD20⁺ (В-лимфоциты).

Оценка фагоцитарной функции нейтрофилов периферической крови проводилась в НСТ-тесте (в спонтанном и стимулированном вариантах); в качестве стимулятора служил опсонизированный зимозан [Нагоев и др., 1981]. Метод основан на «активации фагоцитов», при которой происходит резкое усиление окислительной реакции. Индикатором реакции является нитротетразолиевый синий, который под влиянием окислительных процессов внутри поглотившей его клетки превращается в нерастворимый формазан, обнаруживаемый в виде темно-синих гранул.

В сыворотке крови методом радиальной иммунодиффузии по Манчини [1964] исследовали уровень основных классов иммуноглобулинов (IgM, IgG,) и циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) полиэтиленгликолем методом.

Инфекционный титр вируса в легких мышей определяли пассажем на культуре клеток МДСК, используя десятикратные разведения.

Для оценки в сравнительном аспекте влияния вируса гриппа и препарата на экспрессию генов основных регуляторных цитокинов было проведено исследование транскрипции 10 генов в клетках иммунной системы: интерлейкинов IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, фактора некроза опухоли ФНО- α ; интерферонов ИФН- α , ИФН- γ . Об активации экспрессии генов судили по наличию мРНК цитокинов в мононуклеарах периферической крови (МПК). Определение мРНК проводили с использованием методов обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Выделение РНК осуществляли согласно методу Chomczynsky, Sacchi [1987] методом кислой гуанидин-тиоцианат-фенол-хлороформенной экстракции. Обратная транскрипция и ПЦР-амплификация были выполнены в соответствии с методикой, предложенной Gelder et al., 1995. В работе были использованы пары праймеров для исследуемых цитокинов: ИФН- α [Gelder et al., 1995], ИЛ-6, ИЛ-8 [Lin et al., 1998], ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10 ФНО- α , ИФН- γ [Yamamura et al., 1991], ИЛ-12 [Harrison, Levitz, 1996]. В качестве положительного контроля использовали β -актин [Lin et al., 1998]. Регистрацию результатов ПЦР осуществляли электрофоретически в 2,5% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Для идентификации нуклеотидных последовательностей использовали маркер для электрофореза (G 1758) фирмы Promega.

Количество ПЦР-продуктов анализировали с использованием денситометрической программы ImageJ 1.36 (NIH, USA). Оценку уровня изучаемых мРНК проводили по отношению абсолютной люминесценции мРНК цитокина к люминесценции мРНК контроля фона – β -актина.

Учет результатов экспериментов проводили по показателям экспрессии цитокинов (относительного уровня соответствующей мРНК) в группах животных, получавших препарат по отношению к контрольной группе.

Рассчитывали средние значения по каждой группе животных со среднестатистическим отклонением в системе Microsoft Excel.

Цифровой материал подвергался статистической обработке с использованием метода Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Мышей распределяли в группы по 10 животных в каждой. Было сформировано 11 опытных и 1 контрольная группа – контроль инфицирующей дозы вируса. Результаты исследований представлены в таблице 1.

В группе мышей, зараженных вирусом и не получавших препарат, гибель началась на 5-й день после заражения, к 7-му дню гибель мышей в группе зараженных вирусом прекратилась.

Относительная средняя продолжительность жизни в группе контроля вируса составила 8,0 дней при 70,0% гибели (30% выживаемости).

При профилактическом применении Стелланина за 24 часа до заражения вирусом защита составила 57,1%, продолжительность жизни увеличилась до 17,5 дней, выживаемость мышей составила 70,0 %.

При лечебной схеме введения препарата (применение Стелланина через 24 часа после инфицирования) выживаемость инфицированных мышей составила 60,0 %. Относительная средняя продолжительность жизни мышей по сравнению с контролем увеличилась соответственно до 16,0 дней. Индекс защиты составил 42,9%.

Таблица 1

Изучение противовирусной активности препаратов Стелланин, 1,3-диэтилбензимидазолия йодид и Глутоксим в отношении вируса гриппа на модели экспериментальной инфекции у мышей

Режим применения препаратов	летальность (сутки после заражения/ n)											Всего животных в группе (n)	Общая летальность (%)	Средняя продолжительность жизни (сутки)		Индекс защиты (%)
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	20			относит.*	по сравнению с контролем	
Однодневное двукратное применение препарата																
Стелланин однодневное введение 40 мг/кг п/о за 24 часа до инфицирования	2	1										10	30,0	17,5	+9,4	57,1
Стелланин однодневное введение 40 мг/кг п/о через 24 часа после инфицирования	1	1	2									10	40,0	16,0	+7 ,9	42,9
1,3-диэтилбензимидазолия йодид однодневное введение 20 мг/кг, п/о за 24 часа до инфицирования	2	1	1									10	40,0	14,1	+6,0	42,9
1,3-диэтилбензимидазолия йодид однодневное введение 20 мг/кг, п/о через 24 часа после инфицирования	2	2	1									10	50,0	11,5	+3,4	28,6
Глутоксим, однодневное введение 10 мг/кг, в/б за 24 часа до инфицирования	2	2	1									10	50,0	11,5	+3,3	28,6
Глутоксим, однодневное введение 10 мг/кг, в/б через 24 часа после инфицирования	2	3	1									10	60,0	9,6	+1,4	14,5
Курсовое применение препарата																
Стелланин, 40 мг/кг, п/о, курсовое введение								1				10	10,0	120,5	+112,5	85,7
Стелланин, 20 мг/кг, п/о, курсовое введение	1	1	1			1						10	40,0	16,3	+8,3	42,9
Стелланин, 10 мг/кг, п/о, курсовое введение		1	1	1	2							10	50,0	15,2	+7 ,2	28,6
Стелланин, 5 мг/кг, п/о, курсовое введение	1	1		2		1		1				10	60,0	12,5	+4,5	14,5
Глютоксим, 10 мг/кг, в/б, курсовое введение	3	1	2	1								10	70,0	8,5	+0,5	-
Мыши, зараженные вирусом	3	3	1									10	70,0	8,0	-	-

Профилактическое применение 1,3-диэтилбензимидазолия йодида за 24 часа до заражения вирусом определило уровень индекса защиты 42,9%, продолжительность жизни увеличилась до 14,1 дней, выживаемость мышей составила 60,0 %.

При лечебной схеме введения 1,3-диэтилбензимидазолия йодида выживаемость инфицированных мышей составила 50,0 %. Относительная средняя продолжительность жизни мышей по сравнению с контролем увеличилась соответственно до 11,5 дней. Индекс защиты составил 28,6%.

При профилактическом применении препарата сравнения Глутоксима в его эффективной терапевтической дозе 10 мг/кг [Можокина и др., 2002; Шепелева, 2009] защита составляет 28,6%, продолжительность жизни увеличивается до 11,5 дней, выживаемость мышей составила 50,0 %.

При лечебной схеме введения препарата Глутоксим выживаемость инфицированных мышей составляет 40,0 %. Относительная средняя продолжительность жизни мышей по сравнению с контролем увеличивается соответственно до 9,6 дней. Индекс защиты составляет 14,5%.

Изучение курсового применения препарата Стелланин и препарата сравнения Глутоксим показало, что Стелланин при 8-дневном курсе оказывает выраженное дозозависимое защитное действие при инфицировании животных вирусом гриппа. Максимальный эффект отмечен при дозе препарата 40 мг/кг перорально. При этом индекс защиты составляет 85,7 %, продолжительность жизни увеличивается до 112,5 дней, выживаемость мышей составляет 90,0 %.

В то же время, при курсовом применении Глутоксим терапевтическая активность Глутоксима резко снижается. Продолжительность жизни животных увеличивается лишь на 0,5 дня (до 8,5 дней), выживаемость мышей сравнивается с нелечеными животными и составляет 30%.

Таким образом, препараты «Стелланин» (1,3-диэтилбензимидазолия трийодид), 1,3-диэтилбензимидазолия йодид и Глутоксим оказывают защитное действие в отношении экспериментальной гриппозной инфекции при обеих схемах однократного 2-кратного введения препарата при инфицировании вирусом.

Причем максимальной активностью обладает Стелланин, его метаболит – 1,3-диэтилбензимидазолия йодид незначительно уступает Стелланину, а препарат сравнения Глутоксим оказывает минимальное противовирусное действие, уступая по терапевтической эффективности обоим производным бензимидазолия.

При курсовом применении Стелланин обладает чрезвычайно высокой протективной в отношении гриппозной инфекции активностью. В то же время, терапевтическая активность Глутоксима в тех же условиях резко снижается.

Выявленный терапевтический эффект препарата Стелланин при его однократном применении протекал на фоне статистически значимого снижения титра вируса гриппа в легких животных относительно контроля, что было отмечено на 6-й, а особенно на 12-й дни эксперимента (табл. 2, 3). То есть, необходимо заключить, что Стелланин обладает противовирусной активностью в отношении вируса гриппа A/Aichi/1/68 (H3N2).

Данные о протективном эффекте препарата хорошо коррелируют с результатами изучения иммунного статуса животных. Так, на 6-ые и 12-ые сутки после инфицирования животных у мышей, получавших Стелланин, уровень в крови иммуноглобулинов IgM, с которыми связан первичный иммунный ответ, статистически значимо превышал их концентрацию у нелеченных животных (табл. 2, 3).

Кроме того, отмечено достоверное превышение на 12-й день эксперимента у мышей опытных групп в сравнении с контрольными животными содержания в крови иммуноглобулинов IgG (табл. 3), играющих главную роль в обеспечении длительного гуморального иммунитета при инфекционных заболеваниях и производимых зрелыми В-лимфоцитами.

Действительно, проведенные эксперименты свидетельствуют о том, что применение препарата статистически значимо повышало процентное содержание В-лимфоцитов (маркер CD20+) над уровнем контрольной группы (табл. 2), что и обеспечивало, по-видимому, развитие гуморального ответа при действии Стелланина.

Таблица 2

Показатели клеточных и гуморальных звеньев иммунной системы мышей через 6 дней после инфицирования животных вирусом и/или однодневного введения Стелланина

Показатель иммунного статуса	Интактные мыши	Контрольная группа: вирус без лечения	Препарат	Опытные группы: введение препарата относительно заражения вирусом	
				За 24 часа	Через 24 часа
Лейкоциты $10^9/\text{л}$	10,8±0,6	11,7±0,6	11,3±0,8	10,7±0,6	9,6±0,7
Лимфоциты %	46,6±2,8	48,8±2,3	44,9±1,8	46,9±3,3	44,5±1,9
Лимфоциты $10^9/\text{л}$	5,0±0,1	5,3±0,3	5,0±0,7	5,4±0,4	5,2±0,9
Т-лимфоциты - CD3+, %	63,8±3,6	45,8±1,7	65,2±2,1	63,7±1,2*	55,6±1,1*
Т-лимфоциты - CD3+, $10^9/\text{л}$	3,2±0,19	2,5±0,3	3,3±0,8	3,5±0,9*	3,0±0,5
В-лимфоциты - CD20+, %	14,2±1,33	11,8±2,0	16,7±1,1	15,4±1,2*	15,1±1,4*
В-лимфоциты - CD20+, $10^9/\text{л}$	0,7±0,07	0,7±0,1	0,9±0,4	0,9±0,3	0,8±0,2
Т-хелперы/индукторы - CD4+	52,2±3,92	29,6±1,9	50,7±3,9	48,8±1,7*	42,8±5,4*
Т-киллеры/супрессоры - CD8+	11,6±1,5	16,2±3,9	14,5±1,0	14,5±1,4	12,8±4,2
Фагоцитирующие нейтрофилы	40,2±2,1	42,2±1,7	44,5±4,2	44,3±3,8	42,8±1,9
Иммуноглобулины IgM, г/л	0,5±0,4	2,2±0,8	0,3±0,1	4,2±0,8*	4,7±0,6*
Иммуноглобулины IgG общие, г/л	3,0±0,9	4,2±0,8	3,8±0,9	5,6±0,5	5,4±0,8
Циркулирующие иммунные комплексы	23,4±2,42	43,0±9,2	25,6±1,9	48,2±1,2	42,1±5,2
Инфекционный титр вируса в легких (Ig)	-	2,0±0,7	-	1,0±0,8*	0,8±0,4*

* - Достоверные отличия от контрольной группы (P<0,05).

Таблица 3

Показатели клеточных и гуморальных звеньев иммунной системы мышей через 12 дней после инфицирования животных вирусом и/или однодневного введения Стелланина

Показатель иммунного статуса	Интактные мыши	Контрольная группа: вирус без лечения	Препарат	Опытные группы: введение препарата относительно заражения вирусом	
				За 24 часа	Через 24 часа
Лейкоциты $10^9/\text{л}$	10,8±0,6	7,8±0,3	11,8±0,7	10,2±0,7	10,6±1,3
Лимфоциты %	46,6±2,8	47,4±1,9	48,6±1,9	49,3±1,6	49,2±2,1
Лимфоциты $10^9/\text{л}$	5,0±0,1	5,5±0,2	4,8±0,4	5,1±0,4	4,8±0,7
Т-лимфоциты - CD3+, %	63,8±3,6	59,2±3,2	63,5±2,6	67,2±2,4*	63,8±4,2
Т-лимфоциты - CD3+, $10^9/\text{л}$	3,2±0,2	2,8±0,1	3,2±0,5	3,6±0,4*	3,2±0,8
В-лимфоциты - CD20+, %	14,2±1,33	14,8±1,3	13,3±2,1	15,1±1,2	14,7±1,3
В-лимфоциты - CD20+, $10^9/\text{л}$	0,7±0,07	0,7±0,1	0,9±0,2	1,0±0,2	0,9±0,2
Т-хелперы/индукторы - CD4+	52,2±3,92	47,2±2,8	51,0±1,8	56,5±3,1*	52,0±1,4
Т-киллеры/супрессоры - CD8+	11,6±1,5	12,0±0,9	12,5±1,7	10,7±1,2	11,6±1,1
Фагоцитирующие нейтрофилы	40,2±2,1	41,8±1,6	43,1±1,8	42,3±1,5	41,4±2,3
Иммуноглобулины IgM, г/л	0,5±0,4	1,4±0,5	0,6±0,1	3,5±0,2*	3,6±1,1*
Иммуноглобулины IgG общие, г/л	3,0±0,9	5,6±1,4	3,8±1,2	11,0±1,0*	12,3±1,5*
Циркулирующие иммунные комплексы	23,4±2,42	30,2±1,72	20,2±1,7	20,7±2,1	25,6±2,1
Инфекционный титр вируса в легких (Ig)	10,8±0,6	0,8±0,4	-	0,2±0,2*	0,2±0,1*

* - Достоверные отличия от контрольной группы (P<0,05).

Инфицирование животных вирусом гриппа приводило к снижению уровня молекулярных маркеров CD3+ и CD4+ по сравнению с интактными животными. В то же время, применение Стелланина повышало данный показатель относительно контрольной группы (табл. 2, 3), что свидетельствует об увеличении количества зрелых Т-лимфоцитов (маркер CD3+) и, в первую очередь, Т-хелперов/индукторов (CD4+). Эти клетки весьма многофункциональны и подразделяются на подтипы. Th1-клетки активируют специфический клеточный иммунитет и способны синтезировать интерлейкины IL-2, IL-12, интерферон- γ и лимфотоксин. Кроме того, Th1-клетки активируют к пролиферации и дифференцировке цитотоксические Т-лимфоциты. Th2-клетки продуцируют интерлейкины IL-4, IL-5, IL-6 и IL-10, а также активируют специфический гуморальный иммунный ответ, стимулируя к пролиферации и дифференцировке В-лимфоциты в антителообразующие клетки в ответ на антигенный/инфекционный стимул. По-видимому, отмеченная выше активация синтеза иммуноглобулинов и повышение уровня В-лимфоцитов при применении препарата может обеспечиваться за счет выявленного увеличения уровня Т-хелперов/индукторов Th2-типа.

Однодневное применение метаболита Стелланина – 1,3-диэтилбензимидазодия йодида вызывало изменения в иммунном статусе животных, очень близких к действию Стелланина. Инфекционный титр вируса достоверно снижался по сравнению с контрольными значениями к 12-ым суткам наблюдений (табл. 5). В то же время, преимущественно на 6-ые сутки после инфицирования животных у мышей, получавших 1,3-диэтилбензимидазодия йодид, повышался уровень в крови иммуноглобулинов IgM (табл. 4). Также отмечено достоверное превышение на 6-й и на 12-й день эксперимента у мышей опытных групп по сравнению с контрольными животными содержания в крови иммуноглобулинов IgG (табл. 4, 5).

Заражение животных вирусом гриппа без лечения приводило к снижению относительного содержания Т-лимфоцитов и уровня молекулярного маркера CD4+ по сравнению с незараженными животными на 6-й день инфицирования (табл. 4), а применение 1,3-диэтилбензимидазодия йодида нормализовало данные показатели, повышая их значения относительно контрольной группы (табл. 4, 5).

Таблица 4

Показатели клеточных и гуморальных звеньев иммунной системы мышей через 6 дней после инфицирования животных вирусом и/или однодневного введения 1,3-

диэтилбензимидазолия йодида

Показатель иммунного статуса	Интактные мыши	Контрольная группа: вирус без лечения	Препарат	Опытные группы: введение препарата относительно заражения вирусом	
				За 24 часа	Через 24 часа
Лейкоциты $10^9/\text{л}$	10,8±0,6	12,6±1,1	12,3±0,8	14,8±1,2	13,7±1,4
Лимфоциты %	46,6±2,8	49,1±2,4	46,8±1,9	47,1±1,2	45,9±2,2
Лимфоциты $10^9/\text{л}$	5,0±0,1	5,3±0,1	5,2±0,2	5,1±0,3	5,1±0,2
Т-лимфоциты - CD3+, %	63,8±3,6	44,3±1,7	62,0±0,6	60,7±2,3*	56,2±2,1*
Т-лимфоциты - CD3+, $10^9/\text{л}$	3,2±0,2	2,5±0,5	3,1±0,8	2,9±0,7	2,9±0,6
В-лимфоциты - CD20+, %	14,2±1,3	12,0±1,4	15,8±1,1	14,4±1,0	14,8±1,8
В-лимфоциты - CD20+, $10^9/\text{л}$	0,7±0,1	0,6±0,1	0,8±0,2	0,7±0,3	0,8±0,1
Т-хелперы/индукторы - CD4+	52,2±3,9	30,8±1,8	51,8±3,7	49,1±1,7*	46,4±1,4*
Т-киллеры/супрессоры - CD8+	11,6±1,5	13,5±0,9	10,2±1,4	11,4±1,0	9,8±0,4
Фагоцитирующие нейтрофилы	40,2±2,1	42,1±0,8	42,0±1,4	43,0±1,1	44,8±1,2
Иммуноглобулины IgM, г/л	0,5±0,4	2,0±0,8	0,5±0,1	3,8±0,7*	4,2±0,6*
Иммуноглобулины IgG общие, г/л	3,0±0,9	4,4±0,5	3,2±0,9	5,0±0,6	5,6±0,5*
Циркулирующие иммунные комплексы	23,4±2,4	47,8±0,8	22,0±0,7	48,6±1,4	40,8±1,0
Инфекционный титр вируса в легких (Ig)	-	1,6±0,3	-	1,6±0,4	2,2±0,2

* - Достоверные отличия от контрольной группы (P<0,05).

Таблица 5

Показатели клеточных и гуморальных звеньев иммунной системы мышей через 12 дней после инфицирования животных вирусом и/или однодневного введения 1,3-

диэтилбензимидазолия йодида

Показатель иммунного статуса	Интактные мыши	Контрольная группа: вирус без лечения	Препарат	Опытные группы: введение препарата относительно заражения вирусом	
				За 24 часа	Через 24 часа
Лейкоциты $10^9/\text{л}$	10,8±0,6	7,8±0,3	11,8±0,7	10,2±0,7	10,6±1,3
Лимфоциты %	46,6±2,8	47,4±1,9	48,6±1,9	49,3±1,6	49,2±2,1
Лимфоциты $10^9/\text{л}$	5,0±0,1	5,5±0,2	4,8±0,4	5,1±0,4	4,8±0,7
Т-лимфоциты - CD3+, %	63,8±3,6	59,2±3,2	63,5±2,6	67,2±2,4*	63,8±4,2
Т-лимфоциты - CD3+, $10^9/\text{л}$	3,2±0,2	2,8±0,1	3,2±0,5	3,6±0,4*	3,2±0,8
В-лимфоциты - CD20+, %	14,2±1,33	14,8±1,3	13,3±2,1	15,1±1,2	14,7±1,3
В-лимфоциты - CD20+, $10^9/\text{л}$	0,7±0,07	0,7±0,1	0,9±0,2	1,0±0,2	0,9±0,2
Т-хелперы/индукторы - CD4+	52,2±3,92	47,2±2,8	51,0±1,8	56,5±3,1*	52,0±1,4
Т-киллеры/супрессоры - CD8+	11,6±1,5	12,0±0,9	12,5±1,7	10,7±1,2	11,6±1,1
Фагоцитирующие нейтрофилы	40,2±2,1	41,8±1,6	43,1±1,8	42,3±1,5	41,4±2,3
Иммуноглобулины IgM, г/л	0,5±0,4	1,4±0,5	0,6±0,1	3,5±0,2*	3,6±1,1*
Иммуноглобулины IgG общие, г/л	3,0±0,9	5,6±1,4	3,8±1,2	11,0±1,0*	12,3±1,5*
Циркулирующие иммунные комплексы	23,4±2,42	30,2±1,72	20,2±1,7	20,7±2,1	25,6±2,1
Инфекционный титр вируса в легких (Ig)	10,8±0,6	0,8±0,4	-	0,2±0,2*	0,2±0,1*

* - Достоверные отличия от контрольной группы (P<0,05).

Полученные результаты о близком сходстве эффектов Стелланина и 1,3-диэтилбензимидазолия йодида прямо свидетельствуют о том, что иммуностимулирующий эффект Стелланина опосредуется действием его метаболита.

Курсовое 8-дневное применение Стелланина подтверждает его выраженное иммуностимулирующее действие, которое имеет нарастающий дозозависимый характер. Максимальный эффект препарат проявлял при дозе 40 мг/кг. Было отмечено, что введение Стелланина нормализует общее содержание лейкоцитов как на 6-й, так и на 12-й дни эксперимента (табл. 6, 7).

Инфицирование вирусом гриппа вызывает снижение уровня маркеров CD3+ и CD4+ по сравнению с интактными животными. Как и в случае с однократным введением, применение препарата и на 6-й и на 12-й дни курса повышает данный показатель относительно контрольной группы (табл. 6, 7), что свидетельствует об увеличении количества зрелых Т-лимфоцитов (CD3+) и Т-хелперов/индукторов (CD4+).

Кроме того, на 6-й день эксперимента отмечено увеличение процентного содержания маркера CD20+, что свидетельствует в пользу повышения содержания В-лимфоцитов и обеспечивает, по-видимому, развитие гуморального иммунитета.

Действительно, на 6-й день курса препарата отмечен рост содержания иммуноглобулинов IgM (первичный иммунный ответ), а на 6-й и 12-й дни эксперимента происходит увеличение концентрации иммуноглобулинов IgG (длительный гуморальный иммунитет), продуцируемых зрелыми В-лимфоцитами.

При этом отмечено снижение концентрации циркулирующих иммунных комплексов по сравнению с группой нелеченных животных, а также значительное уменьшение инфекционного титра вируса гриппа в легких.

Таким образом, препарат Стелланин (1,3-диэтилбензимидазолия трийодид) оказывает значимое иммуностимулирующее воздействие на лабораторных животных как при однократном, так и при хроническом его применении.

Таблица 6

Показатели клеточных и гуморальных звеньев иммунной системы мышей через 6 дней после инфицирования животных вирусом и/или курсового 8-дневного введения Стелланина

Показатель иммунного статуса	Интактные мыши	Контрольная группа: вирус без лечения	Доза Стелланина 5 мг/кг		Доза Стелланина 10 мг/кг		Доза Стелланина 20 мг/кг		Доза Стелланина 40 мг/кг	
			Препарат	Препарат на фоне вируса	Препарат	Препарат на фоне вируса	Препарат	Препарат на фоне вируса	Препарат	Препарат на фоне вируса
Лейкоциты $10^9/\text{л}$	10,1±0,4	16,4±0,7	11,3±1,1	15,3±1,1	11,2±1,4	14,7±1,1*	9,6±0,6	13,1±1,2*	11,2±0,5	10,3±1,3*
Лимфоциты %	46,1±1,9	48,3±2,1	45,4±1,7	47,4±2,3	53,9±3,2	50,1±3,7	47,8±1,9	49,8±7,2	48,1±1,9	44,6±1,7
Лимфоциты $10^9/\text{л}$	4,9±0,2	5,4±0,3	4,9±0,3	5,3±0,1	5,2±0,6	5,4±0,7	5,0±0,3	5,5±0,5	4,9±0,3	5,3±0,8
Т-лимфоциты - CD3+, %	60,1±3,2	46,7±2,3	62,3±4,2	49,7±3,4	63,5±4,5	50,2±2,1*	64,6±3,1	58,7±1,6*	68,1±3,2	66,8±1,0*
Т-лимфоциты - CD3+, $10^9/\text{л}$	2,9±0,2	2,5±0,3	3,1±0,3	2,8±0,4	3,2±0,7	2,7±0,9	3,6±0,1	2,8±0,7	3,0±0,2	3,1±0,4
В-лимфоциты - CD20+, %	11,7±1,1	11,9±2,1	12,8±1,4	11,7±2,3	13,1±1,3	13,8±1,5	13,3±1,2	11,7±3,1	12,7±1,1	14,8±1,2*
В-лимфоциты - CD20+, $10^9/\text{л}$	0,6±0,1	0,7±0,1	1,1±0,4	0,8±0,1	0,8±0,2	0,9±0,2	0,7±0,2	0,6±0,2	0,7±0,1	0,8±0,1
Т-хелперы/индукторы - CD4+	47,8±4,1	27,2±2,2	49,3±3,7	30,7±2,2	52,3±1,9	31,8±2,4*	53,2±1,7	46,6±2,4*	55,8±4,1	54,3±4,7*
Т-киллеры/супрессоры - CD8+	12,3±1,2	19,5±3,8	11,4±1,3	15,2±3,1	11,2±1,1	18,4±5,1	11,4±0,6	12,1±1,2	12,3±1,2	12,5±3,1
Фагоцитирующие нейтрофилы	41,3±2,3	43,3±1,3	43,7±4,2	42,3±3,8	42,3±4,1	43,3±5,1	42,4±7,8	41,9±5,7	41,3±2,3	40,7±1,6
Иммуноглобулины IgM, г/л	0,8±0,2	2,8±0,7	1,1±0,3	2,9±0,8	1,3±0,5	2,9±0,9	1,1±0,3	3,6±1,1	1,0±0,2	5,1±0,7*
Иммуноглобулины IgG общие, г/л	3,1±0,9	5,2±0,9	3,2±0,6	5,4±0,7	3,8±0,6	5,9±0,7	3,5±0,7	5,2±0,9	4,1±0,9	6,4±0,6
Циркулирующие иммунные комплексы	25,3±2,6	52,1±10,1	28,3±2,3	45,4±9,7	23,5±2,1	35,6±3,6*	28,7±1,2	33,5±3,8*	21,3±2,6	37,1±4,9*
Инфекционный титр вируса в легких (lg)	-	2,3±0,9	-	2,1±0,7	-	1,8±0,9	-	1,5±0,5	-	0,6±0,2*

* - Достоверные отличия от контрольной группы (P<0,05).

Таблица 7

Показатели клеточных и гуморальных звеньев иммунной системы мышей через 12 дней после инфицирования животных вирусом и/или курсового 8-дневного введения Стелланина

Показатель иммунного статуса	Интактные мыши	Контрольная группа: вирус без лечения	Доза Стелланина 5 мг/кг		Доза Стелланина 10 мг/кг		Доза Стелланина 20 мг/кг		Доза Стелланина 40 мг/кг	
			Препарат	Препарат на фоне вируса	Препарат	Препарат на фоне вируса	Препарат	Препарат на фоне вируса	Препарат	Препарат на фоне вируса
Лейкоциты $10^9/\text{л}$	9,8±0,3	7,9±0,4	10,7±0,9	9,7±0,6*	10,7±1,2	9,8±0,5*	10,1±0,5	11,7±1,3*	12,1±0,7	9,6±1,1
Лимфоциты %	42,3±2,3	49,3±2,1	43,5±2,1	48,7±2,4	54,7±1,5	48,7±2,4	48,9±1,7	49,4±2,3	49,3±1,8	51,2±1,8
Лимфоциты $10^9/\text{л}$	4,1±0,4	5,3±0,2	4,2±0,9	5,4±0,4	5,3±0,7	5,2±1,2	5,1±0,5	5,4±0,7	5,1±0,4	5,6±0,5
Т-лимфоциты - CD3+, %	63,4±4,2	49,4±3,2	64,3±5,1	49,8±4,2	64,8±7,8	56,4±5,2*	68,3±2,1	63,5±5,3*	70,8±2,2	79,3±3,8*
Т-лимфоциты - CD3+, $10^9/\text{л}$	3,3±0,5	2,1±0,1	3,3±0,9	2,6±0,7	3,1±0,8	2,9±1,1	3,2±0,4	3,2±0,9*	3,3±0,5	3,6±0,7*
В-лимфоциты - CD20+, %	12,3±1,2	15,3±0,7	12,9±2,1	12,7±1,4	14,0±2,4	14,9±2,1	13,9±2,3	15,3±2,3	14,1±2,0	16,3±1,1
В-лимфоциты - CD20+, $10^9/\text{л}$	0,8±0,2	0,8±0,2	0,9±0,3	0,8±0,2	0,8±0,1	0,8±0,2	0,8±0,3	0,9±0,1	0,9±0,2	1,2±0,4
Т-хелперы/индукторы - CD4+	50,5±3,8	38,3±3,3	50,8±2,9	39,7±2,7	51,1±2,1	39,9±3,5	55,9±2,4	50,3±2,8*	57,3±1,8	60,8±1,3*
Т-киллеры/супрессоры - CD8+	12,9±0,9	11,1±0,7	12,1±1,8	13,1±2,7	13,7±3,1	16,5±4,7*	12,4±0,8	13,2±4,1	13,5±1,6	11,5±0,9
Фагоцитирующие нейтрофилы	40,5±2,4	43,2±1,6	44,3±5,1	43,4±4,1	41,4±3,7	40,8±4,9	40,3±6,7	42,3±3,3	40,6±1,7	41,5±2,1
Иммуноглобулины IgM, г/л	0,9±0,1	1,7±0,5	1,0±0,2	1,9±0,7	1,2±0,4	2,8±0,8	1,2±0,4	4,1±1,2*	0,9±0,1	4,6±1,2*
Иммуноглобулины IgG общие, г/л	3,3±1,1	5,9±1,5	3,4±0,7	6,1±1,3	4,1±1,2	8,8±1,1*	3,8±0,8	9,7±1,3*	4,2±1,3	10,5±1,3*
Циркулирующие иммунные комплексы	26,4±2,3	32,3±1,2	25,4±1,8	29,7±1,4	22,3±2,3	28,3±3,9	24,3±2,4	27,4±3,1*	22,6±1,7	20,7±2,3*
Инфекционный титр вируса в легких (Ig)	-	0,6±0,4	-	0,6±0,2	-	0,5±0,1	-	0,3±0,1*	-	0,2±0,1*

* - Достоверные отличия от контрольной группы (P<0,05).

Изучение влияния препарата сравнения Глутоксима на показатели иммунного статуса (табл. 8-11) свидетельствует о том, что этот препарат значительно уступает Стелланину и 1,3-диэтилбензимидазолия йодиду по выраженности влияния на показатели иммунного статуса.

Так, и при однодневном, и при курсовом применении Глутоксим не снижает инфекционного титра вируса гриппа в легких экспериментальных животных и не оказывает влияния на концентрацию иммуноглобулинов IgM и IgG ни в один из сроков наблюдения.

Практически не влияет введение Глутоксима при вирусной инфекции и на уровень CD20+, что свидетельствует в пользу отсутствия воздействия этого препарата на уровень В-лимфоцитов.

В то же время, отмечено, что однодневное применение Глутоксима на фоне заражения животных вирусом гриппа повышает показатели CD3+ и CD4+ относительно контрольной группы (табл. 8, 9), что свидетельствует об увеличении количества зрелых Т-лимфоцитов (CD3+) и Т-хелперов/индукторов (CD4+). Причем отмечено, что при курсовом введении Глутоксима его влияние на содержание маркеров CD3+ и CD4+ уже прекращается (табл. 10, 11).

В исследованиях также отмечено, что курсовое применение Глутоксима вызывает достоверное повышение общего уровня лейкоцитов в крови мышей на фоне вирусной инфекции.

Таким образом, необходимо заключить, что препараты Стелланин и 1,3-диэтилбензимидазолия йодид обладают выраженным стимулирующим действием на иммунный статус экспериментальных животных при моделировании вирусной инфекции, активируя как Th1-тип, так и Th2-тип иммунного ответа (клеточный и гуморальный иммунитет, соответственно). Причем иммуностропное действие Стелланина опосредуется непосредственным действием его метаболита – 1,3-диэтилбензимидазолия йодида.

В то же время, современный иммуностимулирующий препарат Глутоксим значительно уступает по выраженности влияния на статус иммунной системы препарату Стелланин и его метаболиту.

Таблица 8

Показатели клеточных и гуморальных звеньев иммунной системы мышей через 6 дней после инфицирования животных вирусом и/или однодневного введения Глутоксима

Показатель иммунного статуса	Интактные мыши	Контрольная группа: вирус без лечения	Препарат	Введение препарата относительно заражения вирусом за 24 часа
Лейкоциты $10^9/\text{л}$	10,6±0,6	12,8±0,7	12,7±0,7	14,8±1,3
Лимфоциты %	46,7±2,1	49,7±2,3	43,8±1,8	47,1±2,8
Лимфоциты $10^9/\text{л}$	5,0±0,2	5,4±0,3	5,0±0,3	5,0±0,8
Т-лимфоциты - CD3+, %	62,8±3,1	42,8±1,5	63,2±0,7	60,7±2,8*
Т-лимфоциты - CD3+, $10^9/\text{л}$	3,2±0,2	2,3±0,3	3,3±0,9	2,8±0,6
В-лимфоциты - CD20+, %	13,8±1,4	10,8±2,1	14,7±1,3	14,8±2,3
В-лимфоциты - CD20+, $10^9/\text{л}$	0,8±0,1	0,6±0,2	0,8±0,1	0,8±0,1
Т-хелперы/индукторы - CD4+	52,2±3,7	28,4±2,1	52,9±3,9	47,9±3,4*
Т-киллеры/супрессоры - CD8+	11,6±1,2	14,4±3,1	10,3±1,2	12,8±1,4
Фагоцитирующие нейтрофилы	41,0±2,1	43,4±1,8	42,3±1,5	40,3±2,1
Иммуноглобулины IgM, г/л	0,5±0,2	2,3±0,7	0,7±0,1	3,6±1,1
Иммуноглобулины IgG общие, г/л	3,1±1,1	5,1±0,9	3,8±1,1	4,3±0,9
Циркулирующие иммунные комплексы	24,3±2,5	48,1±10,1	24,3±1,3	52,3±6,7
Инфекционный титр вируса в легких (Ig)	-	2,1±0,8	-	1,6±0,3

* - Достоверные отличия от контрольной группы (P<0,05).

Таблица 9

Показатели клеточных и гуморальных звеньев иммунной системы мышей через 12 дней после инфицирования животных вирусом и/или однодневного введения Глутоксима

Показатель иммунного статуса	Интактные мыши	Контрольная группа: вирус без лечения	Препарат	Введение препарата относительно заражения вирусом за 24 часа
Лейкоциты $10^9/\text{л}$	11,7±0,7	7,6±0,9	12,1±1,2	11,4±3,8
Лимфоциты %	44,3±2,5	49,3±2,7	46,3±1,5	48,3±0,9
Лимфоциты $10^9/\text{л}$	4,3±0,6	5,3±0,4	5,2±0,4	5,2±0,7
Т-лимфоциты - CD3+, %	64,7±5,1	46,7±3,1	62,6±2,4	65,7±1,4*
Т-лимфоциты - CD3+, $10^9/\text{л}$	3,4±0,4	2,5±0,8	2,9±0,8	3,1±0,7
В-лимфоциты - CD20+, %	12,3±1,5	13,8±1,8	15,3±2,6	14,6±0,9
В-лимфоциты - CD20+, $10^9/\text{л}$	0,7±0,1	0,7±0,3	0,8±0,2	0,7±0,1
Т-хелперы/индукторы - CD4+	51,3±4,2	34,4±6,7	50,2±1,2	52,6±4,1*
Т-киллеры/супрессоры - CD8+	13,4±0,8	12,3±2,2	12,4±1,1	13,1±2,3
Фагоцитирующие нейтрофилы	41,3±3,4	43,8±2,1	43,4±2,3	41,9±4,7
Иммуноглобулины IgM, г/л	1,0±0,2	1,8±0,6	1,1±0,4	3,1±1,2
Иммуноглобулины IgG общие, г/л	2,9±1,2	5,4±1,7	2,9±0,9	3,8±0,5
Циркулирующие иммунные комплексы	23,3±2,7	40,3±9,3	24,5±2,6	48,4±5,3
Инфекционный титр вируса в легких (Ig)	-	0,7±0,2	-	0,8±0,2

* - Достоверные отличия от контрольной группы (P<0,05).

Таблица 10

Показатели клеточных и гуморальных звеньев иммунной системы мышей через 6 дней после инфицирования животных вирусом и/или курсового введения Глутоксима

Показатель иммунного статуса	Интактные мыши	Контрольная группа: вирус без лечения	Препарат	Курсовое введение препарата относительно заражения вирусом
Лейкоциты $10^9/\text{л}$	10,1±0,4	16,4±0,7	16,1±3,7	23,7±3,1*
Лимфоциты %	46,1±1,9	48,3±2,1	54,7±2,8	53,8±2,4
Лимфоциты $10^9/\text{л}$	4,9±0,2	5,4±0,3	5,3±1,1	5,6±1,2
Т-лимфоциты - CD3+, %	60,1±3,2	46,7±2,3	64,7±14,3	50,3±2,3
Т-лимфоциты - CD3+, $10^9/\text{л}$	2,9±0,2	2,5±0,3	3,5±0,8	2,5±0,8
В-лимфоциты - CD20+, %	11,7±1,1	11,9±2,1	12,3±1,4	10,7±2,1
В-лимфоциты - CD20+, $10^9/\text{л}$	0,6±0,1	0,7±0,1	0,9±0,1	0,7±0,1
Т-хелперы/индукторы - CD4+	47,8±4,1	27,2±2,2	51,0±8,7	30,6±3,8
Т-киллеры/супрессоры - CD8+	12,3±1,2	19,5±3,8	13,7±1,2	19,7±2,4
Фагоцитирующие нейтрофилы	41,3±2,3	43,3±1,3	45,4±8,1	43,7±6,3
Иммуноглобулины IgM, г/л	0,8±0,2	2,8±0,7	1,1±0,3	3,7±1,3
Иммуноглобулины IgG общие, г/л	3,1±0,9	5,2±0,9	3,5±1,1	6,3±1,1
Циркулирующие иммунные комплексы	25,3±2,6	52,1±10,1	28,3±2,4	68,1±9,7
Инфекционный титр вируса в легких (Ig)	-	2,3±0,9	-	3,3±1,1

* - Достоверные отличия от контрольной группы (P<0,05).

Таблица 11

Показатели клеточных и гуморальных звеньев иммунной системы мышей через 12 дней после инфицирования животных вирусом и/или курсового введения Глутоксима

Показатель иммунного статуса	Интактные мыши	Контрольная группа: вирус без лечения	Препарат	Курсовое введение препарата относительно заражения вирусом
Лейкоциты $10^9/\text{л}$	9,8±0,3	7,9±0,4	13,4±1,3	15,6±1,2*
Лимфоциты %	42,3±2,3	49,3±2,1	51,3±3,5	52,3±3,8
Лимфоциты $10^9/\text{л}$	4,1±0,4	5,3±0,2	5,1±1,7	5,0±1,0
Т-лимфоциты - CD3+, %	63,4±4,2	49,4±3,2	65,4±19,1	48,4±13,3
Т-лимфоциты - CD3+, $10^9/\text{л}$	3,3±0,5	2,1±0,1	3,7±1,1	2,1±0,2
В-лимфоциты - CD20+, %	12,3±1,2	15,3±0,7	14,7±1,1	12,3±1,8
В-лимфоциты - CD20+, $10^9/\text{л}$	0,8±0,2	0,8±0,2	1,2±0,5	0,9±0,3
Т-хелперы/индукторы - CD4+	50,5±3,8	38,3±3,3	50,6±9,8	31,0±6,3
Т-киллеры/супрессоры - CD8+	12,9±0,9	11,1±0,7	14,8±1,9	17,4±9,5
Фагоцитирующие нейтрофилы	40,5±2,4	43,2±1,6	44,7±15,9	45,6±9,3
Иммуноглобулины IgM, г/л	0,9±0,1	1,7±0,5	1,3±0,5	2,1±0,9
Иммуноглобулины IgG общие, г/л	3,3±1,1	5,9±1,5	4,2±1,2	6,7±1,3
Циркулирующие иммунные комплексы	26,4±2,3	32,3±1,2	26,7±1,9	72,1±10,3*
Инфекционный титр вируса в легких (Ig)	-	0,6±0,4	-	0,9±0,3

* - Достоверные отличия от контрольной группы (P<0,05).

Результаты изучения влияния однодневного двукратного применения препарата Стелланина (1,3-диэтилбензимидазолия трийодида) в дозе 40 мг/кг перорально, его метаболита 1,3-диэтилбензимидазолия йодида в дозе 20 мг/кг перорально (препараты применяли в эквимолекулярных дозах) и Глутоксима в дозе 10 мг/кг внутривенно, а также Стелланина при курсовом 8-дневном пероральном введении в дозе 40 мг/кг на уровень экспрессии цитокинов у мышей представлены на рисунках 1-4 и в таблице 12.

Полученные данные однозначно свидетельствуют о существенном воздействии препарата Стелланин на концентрацию мРНК изученных цитокинов. Аналогичное воздействие оказывает и 1,3-диэтилбензимидазолия йодид. Причем динамика изменения экспрессии цитокинов при воздействии обоих препаратов очень схожая (рис. 1, 2). Так, на шестой день после введения оба препарата статистически значимо повышали концентрацию матричной РНК интерферона I типа – ИФН- α , а также интерферона II типа – ИФН- γ . Активация биосинтеза интерферонов, обладающих мощнейшим иммуномодулирующим, противоопухолевым, а также противовирусным действием (причем γ -интерферон отличается от α -интерферона менее выраженной антивирусной и более выраженными иммунорегуляторной и противоопухолевой активностью), свидетельствует об эффективности применения Стелланина и 1,3-диэтилбензимидазолия йодида при состояниях, требующих активации иммунной системы. На 12-е сутки после введения обоих препаратов экспрессия генов ИФН- α и ИФН- γ полностью нормализовалась, приближаясь к контрольному уровню.

Сходное, но значительно менее выраженное воздействие препараты оказывали и на интерлейкин IL-1 β . Известно, что этот цитокин способствует активации фагоцитов, высвобождению медиаторов воспаления – простагландина E₂, тромбоксанов и фактора активации тромбоцитов, а также запускает биосинтез интерлейкинов IL-6 и IL-8.

В то же время, Стелланин и 1,3-диэтилбензимидазолия йодид не влияли на экспрессию ФНО- α ни в один из сроков наблюдения.

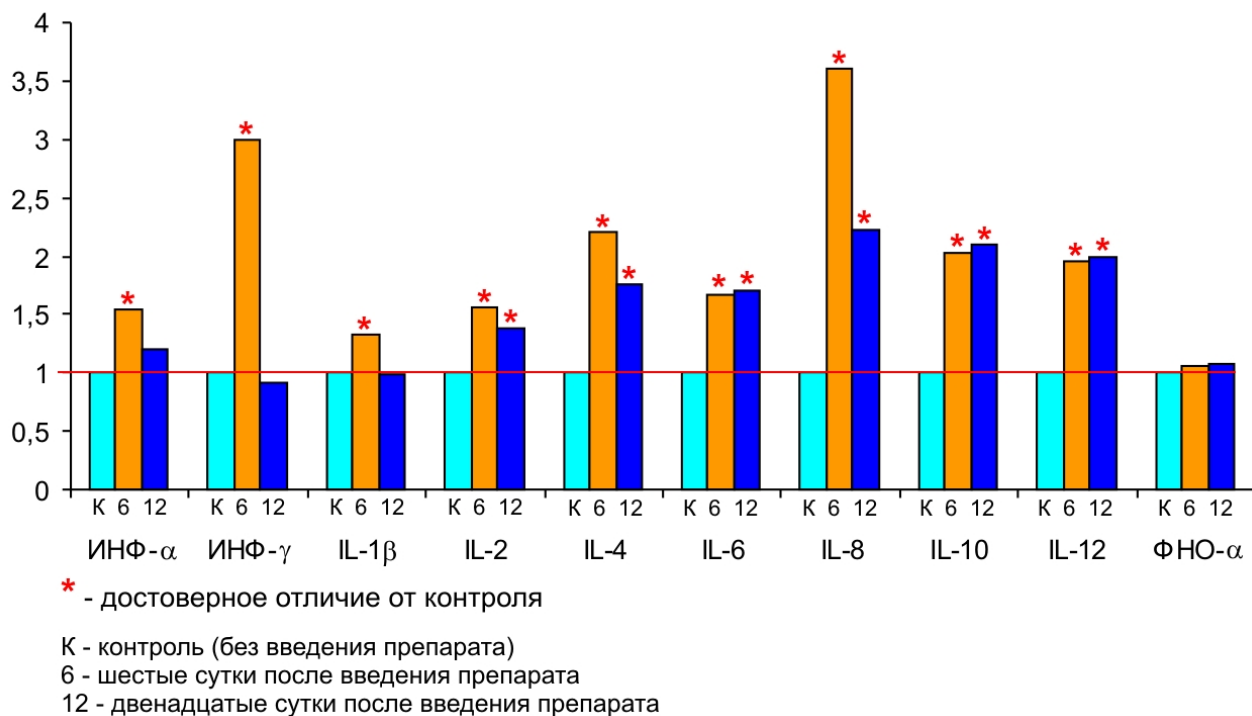


Рис.1. Влияние Стелланина (40 мг/кг, перорально, однократное 2-кратное применение) на экспрессию генов цитокинов.

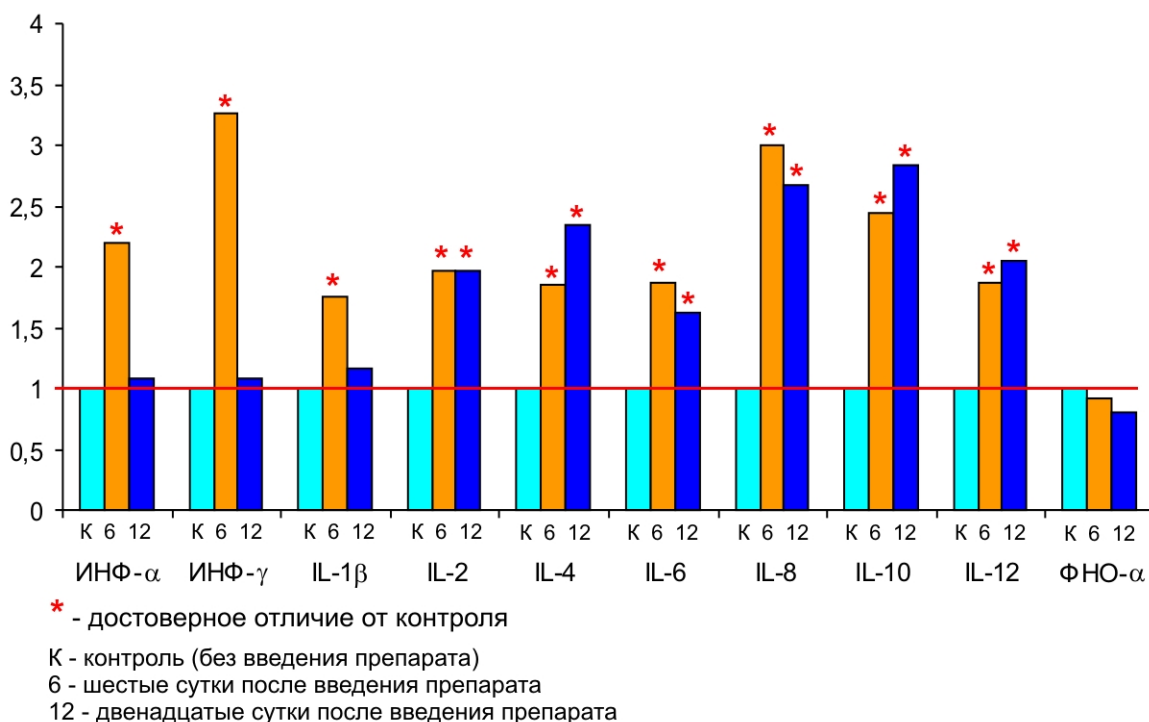


Рис.2. Влияние 1,3-диэтилбензимидазолия йодида (20 мг/кг, перорально, однократное 2-кратное применение) на экспрессию генов цитокинов.

При анализе результатов исследования было отмечено, что оба препарата повышали транскрипцию генов интерлейкинов IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 и IL-12 на 6-й и 12-й дни наблюдения. Интерлейкин IL-2 (вырабатывается Th1-хелперами) индуцирует пролиферацию Т-клеток и созревание цитотоксических Т-лимфоцитов, усиливает функцию моноцитов, стимулирует выработку гамма-интерферона – ИФН- γ . В то же время, цитокины IL-4 и IL-6 принимают участие в развитии Th2-типа иммунного ответа, к примеру, интерлейкин IL-4 является регулятором роста и дифференциации В-лимфоцитов.

Интерлейкин IL-10 обладает многими противовоспалительными свойствами, включая способность подавлять лихорадку. Продуцируется Th2-хелперами и может рассматриваться как антагонист ряда других цитокинов – IL-10 противодействует активации биосинтеза IL-1 β и ФНО- α , что и было отмечено в нашем исследовании: активация экспрессии IL-1 β была кратковременной, а усиления экспрессии ФНО- α вообще не отмечалось. При этом необходимо принимать во внимание, что в организме цитокины IL-1 и ФНО- α усиливают влияние друг друга на местные и общие проявления воспаления, сочетанное действие этих двух цитокинов способно вызвать полиорганную недостаточность. Подавление же их чрезмерной активации устраняет это взаимодействие и заметно улучшает состояние организма в целом.

Интерлейкин IL-12 также относится к противовоспалительным цитокинам и принимает, как и IL-2, участие в развитии Th1-типа иммунного ответа. Продуцируется моноцитами, макрофагами и другими иммунокомпетентными клетками. IL-12 является ключевым цитокином инициации эффективной иммунной защиты, активирует дифференцировку и пролиферацию Т-лимфоцитов, а также продукцию других цитокинов, стимулирует синтез интерферона- γ .

Анализируя влияние Стелланина и его метаболита 1,3-диэтилбензимидазолия йодида на экспрессию цитокинов, необходимо отметить, что оба препарата способны активировать, с одной стороны, транскрипцию генов интерлейкинов IL-2 и IL-12, а также гамма-интерферона, т.е. цитокинов, обуславливающих Th1-тип иммунного ответа (клеточный иммунитет). С другой стороны, Стелланин и его метаболит стимулируют биосинтез интерлейкинов IL-4, IL-6 и IL-10 – цитокинов, принимающих участие в формировании Th2-типа иммунного ответа (гуморальный иммунитет).

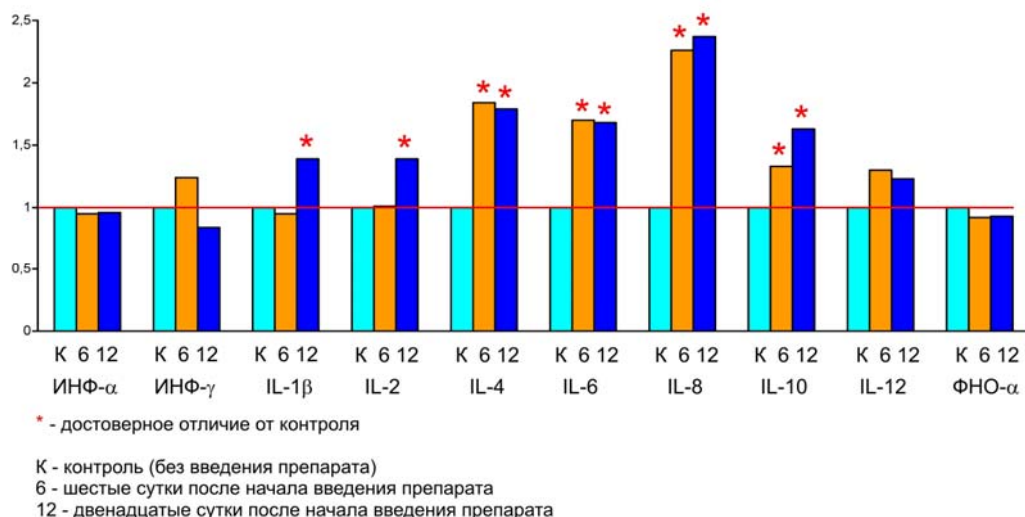


Рис.3. Влияние Глутоксима (10 мг/кг, внутривбрюшинно, однократное 2-кратное применение) на экспрессию генов цитокинов.

В то же время, введение препарата сравнения Глутоксима оказывало значительно менее выраженный эффект на экспрессию цитокинов. Глутоксим не влиял на содержание мРНК интерферонов (α и γ) ни на 6-й ни на 12-й дни после введения. Не изменял препарат и уровня экспрессии интерлейкина IL-12 в эти же сроки наблюдения. На концентрацию мРНК интерлейкина IL-2 Глутоксим оказывал стимулирующее воздействие только на 12-е сутки эксперимента. Таким образом, необходимо отметить, что препарат Глутоксим фактически не оказывал в эксперименте влияния на молекулярные факторы, ответственные за формирование Th1-типа иммунного ответа (клеточного иммунитета). Стимуляция Глутоксимом биосинтеза интерлейкинов IL-4, IL-6 и IL-10 может, тем не менее, свидетельствовать об участии этого препарата в формировании Th2-типа иммунного ответа (гуморального иммунитета).

Наиболее выраженное влияние на экспрессию изученных цитокинов оказал препарат Стелланин при курсовом 8-дневном применении. Проведенные исследования свидетельствуют о том, что препарат 1,3-диэтилбензимидазолия трийодида в значительной степени и статистически достоверно активировал экспрессию интерлейкинов IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 и интерферонов ИФН- α , ИФН- γ , не влияя при этом на экспрессию ФНО- α .

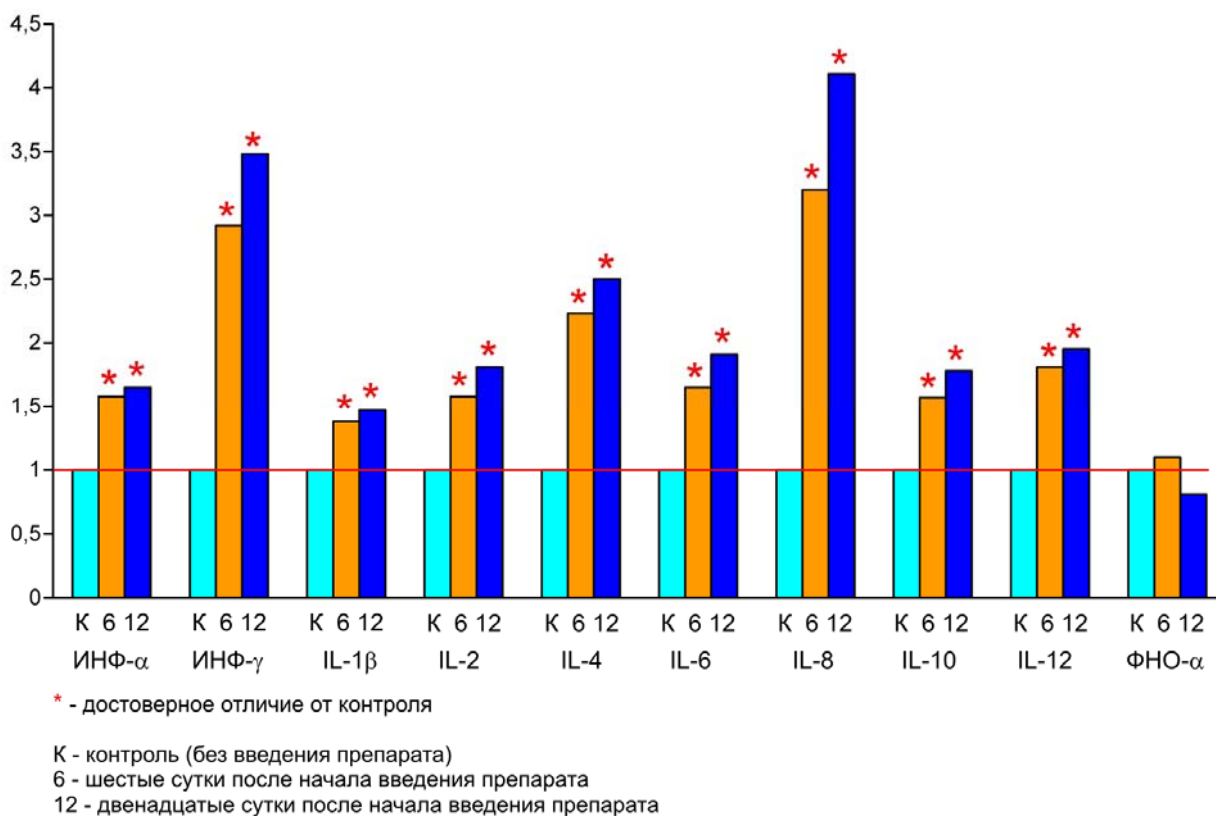


Рис.4. Влияние Стелланина (40 мг/кг, перорально, курсовое 8-дневное применение) на экспрессию генов цитокинов.

Таким образом, необходимо заключить, что препарат Стелланин и его метаболит 1,3-диэтилбензимидазолия йодид значимо и однонаправленно активируют экспрессию таких важнейших сигнальных молекул организма, как цитокины (интерлейкины, интерфероны), регулирующих межклеточные и межсистемные взаимодействия, определяющих выживаемость клеток, стимуляцию или подавление их роста, дифференциацию, функциональную активность и апоптоз. Надо отметить, что препараты обладают весьма пролонгированным действием (эффект длится до 12 суток после введения препаратов) и потенцируют при этом как Th1-, так и Th2-типы иммунного ответа. Необходимо также заключить, что свое влияние на иммунную систему препарат Стелланин реализует, по-видимому, за счет биологической активности своего естественного метаболита – катиона 1,3- диэтилбензимидазолия. При курсовом применении эффект Стелланина на экспрессию цитокинов усиливается и пролонгируется. В то же время, препарат сравнения Глутоксим значительно уступал Стелланину по влиянию на экспрессию цитокинов, фактически не затрагивая факторы, ответственные за формирование Th1-тип иммунного ответа.

Влияние Стелланина (40 мг/кг, п/о) при однократном и курсовом применении, 1,3-диэтилбензимидазолия йодида (20 мг/кг, п/о) и Глутоксима (10 мг, кг, в/б) при однократном применении на экспрессию генов цитокинов

Препарат	Дни наблюдения	Группа	ЦИТОКИНЫ									
			ИНФ- α	ИНФ- γ	IL-1 β	IL-2	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	IL-12	ФНО- α
Стелланин (1,3-диэтилбензимидазолия йодид), Однократно	6	Контроль	7,6 $\pm$ 0,3	2,3 $\pm$ 0,8	23,6 $\pm$ 3,4	10,8 $\pm$ 2,7	9,1 $\pm$ 1,8	19,3 $\pm$ 2,5	1,5 $\pm$ 0,5	6,1 $\pm$ 1,1	18,8 $\pm$ 3,4	15,8 $\pm$ 2,2
		Препарат	11,7 $\pm$ 1,3 **	6,9 $\pm$ 1,1 **	31,1 $\pm$ 5,8 **	16,8 $\pm$ 3,2 **	20,1 $\pm$ 5,7 **	32,1 $\pm$ 7,1 **	5,4 $\pm$ 2,3 **	12,3 $\pm$ 3,3 **	36,6 $\pm$ 6,7 **	16,7 $\pm$ 4,1 -
	12	Контроль	6,7 $\pm$ 0,9	3,2 $\pm$ 0,8	21,2 $\pm$ 4,1	9,7 $\pm$ 1,2	12,1 $\pm$ 3,1	18,7 $\pm$ 3,2	1,3 $\pm$ 0,7	7,3 $\pm$ 2,4	17,4 $\pm$ 5,1	16,2 $\pm$ 2,7
		Препарат	8,1 $\pm$ 1,3 -	2,9 $\pm$ 0,7 -	20,7 $\pm$ 3,8 -	15,3 $\pm$ 3,6 **	21,2 $\pm$ 4,8 **	31,7 $\pm$ 3,7 **	2,9 $\pm$ 1,2 **	15,3 $\pm$ 4,5 **	34,7 $\pm$ 5,6 **	17,3 $\pm$ 3,2 -
Стелланин (1,3-диэтилбензимидазолия йодид), Курс	6	Контроль	8,1 $\pm$ 0,7	2,5 $\pm$ 0,5	25,7 $\pm$ 2,4	11,2 $\pm$ 1,3	10,5 $\pm$ 0,9	20,7 $\pm$ 3,3	1,9 $\pm$ 1,7	9,1 $\pm$ 1,7	19,8 $\pm$ 1,7	16,7 $\pm$ 3,4
		Препарат	12,8 $\pm$ 3,2 **	7,3 $\pm$ 0,9 **	35,4 $\pm$ 3,8 **	17,7 $\pm$ 1,9 **	23,4 $\pm$ 3,6 **	33,7 $\pm$ 3,4 **	6,1 $\pm$ 1,2 **	14,3 $\pm$ 1,2 **	35,8 $\pm$ 4,1 **	18,3 $\pm$ 2,5 -
	12	Контроль	7,8 $\pm$ 0,6	3,3 $\pm$ 0,7	24,2 $\pm$ 3,5	10,7 $\pm$ 1,4	11,2 $\pm$ 1,3	20,3 $\pm$ 3,5	2,1 $\pm$ 1,0	8,7 $\pm$ 0,8	18,8 $\pm$ 1,6	15,9 $\pm$ 2,5
		Препарат	13,4 $\pm$ 2,7 **	8,7 $\pm$ 1,2 **	37,7 $\pm$ 4,1 **	20,3 $\pm$ 2,3 **	26,3 $\pm$ 2,5 **	39,6 $\pm$ 4,3 **	7,8 $\pm$ 1,1 **	16,2 $\pm$ 1,9 **	38,7 $\pm$ 5,2 **	14,3 $\pm$ 3,1 -
1,3-диэтилбензимидазолия йодид, Однократно	6	Контроль	6,9 $\pm$ 1,3	1,9 $\pm$ 0,9	20,2 $\pm$ 4,0	9,3 $\pm$ 2,7	9,1 $\pm$ 1,2	17,8 $\pm$ 3,5	1,4 $\pm$ 0,8	5,4 $\pm$ 2,2	17,4 $\pm$ 2,4	16,1 $\pm$ 3,7
		Препарат	15,1 $\pm$ 2,8 **	6,2 $\pm$ 1,2 **	35,4 $\pm$ 5,4 **	18,3 $\pm$ 2,8 **	16,9 $\pm$ 4,1 **	33,2 $\pm$ 5,7 **	4,2 $\pm$ 1,6 **	13,1 $\pm$ 4,1 **	32,6 $\pm$ 6,2 **	14,8 $\pm$ 2,3 -
	12	Контроль	6,5 $\pm$ 1,8	2,4 $\pm$ 1,1	19,7 $\pm$ 2,7	8,3 $\pm$ 2,3	8,7 $\pm$ 2,6	18,3 $\pm$ 3,6	1,5 $\pm$ 3,5	7,1 $\pm$ 2,1	17,2 $\pm$ 3,5	18,1 $\pm$ 1,6
		Препарат	7,1 $\pm$ 1,1 -	2,6 $\pm$ 1,1 -	23,1 $\pm$ 2,9 -	16,3 $\pm$ 2,4 **	20,4 $\pm$ 5,1 **	29,9 $\pm$ 5,6 **	4,0 $\pm$ 1,2 **	20,1 $\pm$ 3,8 **	35,3 $\pm$ 5,4 **	14,6 $\pm$ 3,1 -
Глутоксим, Однократно	6	Контроль	8,1 $\pm$ 0,7	2,5 $\pm$ 0,5	25,7 $\pm$ 2,4	11,2 $\pm$ 1,3	10,5 $\pm$ 0,9	20,7 $\pm$ 3,3	1,9 $\pm$ 1,7	9,1 $\pm$ 1,7	19,8 $\pm$ 1,7	16,7 $\pm$ 3,4
		Препарат	7,7 $\pm$ 1,2 -	3,1 $\pm$ 0,7 -	24,3 $\pm$ 2,1 -	11,3 $\pm$ 0,9 -	19,3 $\pm$ 2,5 **	35,2 $\pm$ 2,9 **	4,3 $\pm$ 0,7 **	12,1 $\pm$ 1,1 **	25,8 $\pm$ 5,3 -	15,4 $\pm$ 3,6 -
	12	Контроль	7,8 $\pm$ 0,6	3,3 $\pm$ 0,7	24,2 $\pm$ 3,5	10,7 $\pm$ 1,4	11,2 $\pm$ 1,3	20,3 $\pm$ 3,5	2,1 $\pm$ 1,0	8,7 $\pm$ 0,8	18,8 $\pm$ 1,6	15,9 $\pm$ 2,5
		Препарат	7,8 $\pm$ 2,8 -	2,1 $\pm$ 0,7 -	35,6 $\pm$ 3,3 **	15,6 $\pm$ 1,8 **	18,8 $\pm$ 2,3 **	34,7 $\pm$ 4,7 **	4,9 $\pm$ 0,9 **	14,8 $\pm$ 1,4 **	24,3 $\pm$ 9,6 -	15,6 $\pm$ 3,5 -

** – достоверное отличие от контрольных значений при P<0,05.

Инфицирование животных вирусом гриппа А (H3N2) оказывало стимулирующее воздействие на экспрессию генов, ответственных за биосинтез таких биологически активных факторов, как интерлейкины IL-4, IL-6 и IL-8, а также фактора некроза опухоли – ФНО- α через 6 суток после заражения. Через 12 суток повышенная экспрессия интерлейкинов IL-4, IL-6 и ФНО- α сохранялась, а также был отмечен рост экспрессии интерлейкина IL-1 β . Известно, что многие инфекционно-воспалительные заболевания приводят к значительному повышению уровня IL-1 и ФНО- α . Интерлейкин IL-1 запускает биосинтез IL-8, способствующего хемотаксису моноцитов и нейтрофилов. Также важнейшим медиатором острой фазы воспаления является IL-6, его повышенная концентрация в большей степени соответствует выраженности лихорадки и других проявлений инфекции, а его продукция также активируется IL-1 и ФНО- α . В отношении интерлейкина IL-4 необходимо отметить, что он является регулятором процесса биосинтеза В-лимфоцитами антител. Таким образом, отмеченные при инфицировании животных вирусом гриппа изменения в концентрации мРНК цитокинов, обуславливающих в организме развитие острофазового ответа на вирусную инфекцию, в целом соответствуют картине развития инфекционно-воспалительного процесса.

Применение препарата Стелланин при гриппозной вирусной инфекции приводило к более быстрому ответу по активации экспрессии интерлейкина IL-1 β (на 6-й день). Причем концентрация мРНК IL-1 β нормализовалась к 12-му дню эксперимента. Также отмечено, что к 12-м суткам после инфицирования у леченных животных интенсивность экспрессии гена ФНО- α также приближалась к показателям нормы. Подавление активности IL-1 и ФНО- α устраняет их взаимодействие и заметно улучшает состояние больного.

Также было отмечено, что Стелланин на фоне вирусной инфекции повышал транскрипцию генов интерлейкинов IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 и IL-12. Функции этих интерлейкинов отмечались выше.

Изучение экспрессии генов интерферонов (ИНФ) показало, что применение препарата при заражении животных вирусом гриппа приводит к значимому увеличению концентрации матричной РНК интерферона I типа – ИФН- α , а также обуславливающего Th1-тип иммунного ответа интерферона II типа – ИФН- γ .

Активация биосинтеза интерферонов свидетельствует об эффективности применения Стелланина при вирусной инфекции. На 12-е сутки эксперимента при лечении экспериментальной инфекции Стелланином на фоне значимого снижения титра вируса у животных экспрессия гена ИФН- γ снизилась по сравнению 6-ми сутками эксперимента, а экспрессия ИФН- α полностью нормализовалась.

Применение метаболита Стелланина – 1,3-диэтилбензимидазодия йодида при гриппозной вирусной инфекции приводило к выраженной активации экспрессии интерлейкина IL-1 β на 6-й дни эксперимента. Причем к 12-му дню эксперимента концентрация мРНК IL-1 β нормализовалась. Также отмечено, что к 12-м суткам после инфицирования у леченных животных интенсивность экспрессии гена ФНО- α также приближалась к показателям нормы.

Также было отмечено, что, как и Стелланин, 1,3-диэтилбензимидазодия йодид на фоне вирусной инфекции дополнительно повышал транскрипцию генов интерлейкинов IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 и IL-12 практически во все сроки наблюдения (6-й и 12-й дни).

Изучение экспрессии генов интерферонов (ИНФ) показало, что применение препарата при заражении животных вирусом гриппа А (H3N2) приводит на 6-е сутки эксперимента к значимому увеличению концентрации матричной РНК интерферона I типа – ИФН- α и ИФН- γ . На 12-е сутки эксперимента при лечении экспериментальной инфекции 1,3-диэтилбензимидазодия йодидом на фоне значительного снижения титра вируса у животных экспрессия генов ИФН- α и ИФН- γ по сравнению с 6-ми сутками эксперимента полностью нормализовалась.

Таким образом, необходимо отметить сходство воздействия Стелланина и его метаболита – 1,3-диэтилбензимидазодия йодида на экспрессию цитокинов при инфицировании животных вирусом гриппа.

Курсовое применение Стелланина в течение 8 дней при заражении мышей вирусом гриппа приводит к дозозависимой активации экспрессии цитокинов, максимально выраженной при дозе препарата 40 мг/кг. В данных условиях препарат вызывал усиление биосинтеза всех изученных интерлейкинов, интерферонов, в также фактора некроза опухоли – ФНО- α на 6-е сутки после инфицирования животных.

На 12-е сутки эксперимента Стелланин при курсовом введении на фоне вирусной инфекции гриппа активировал экспрессию IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 и IL-12. При этом экспрессия ФНО- α , IL-1 β , ИФН- α и ИФН- γ нормализовалась.

Значительно менее выраженное влияние на экспрессию цитокинов при развитии вирусной инфекции оказывал препарат сравнения Глутоксим и при однократном (2-кратном), и при курсовом (8 суток) применении. Как на 6-й, так и на 12-й дни эксперимента введение Глутоксима приводило к активации только интерлейкинов IL-4, IL-6 и IL-8, а также фактора некроза опухоли – ФНО- α . Т.е., затрагивались только интерлейкины, принимающие участие в развитии Th2-тип иммунного ответа. Причем экспрессия факторов Th1-типа иммунного ответа не изменялась при применении Глутоксима.

Обобщая представленные исследования, необходимо отметить, что препарат Стелланин (1,3-диэтилбензимидазолия трийодид) и его метаболит 1,3-диэтилбензимидазолия йодид значимо активируют экспрессию интерферонов и интерлейкинов. Причем активации подвергается экспрессия факторов, участвующих в развитии как Th1-типа иммунного ответа (клеточный иммунитет), так и Th2-типа иммунного ответа (гуморальный иммунитет). Необходимо отметить, что активность Стелланина усиливается при его курсовом применении, а физиологический эффект опосредуется, по-видимому, действием метаболита препарата – 1,3-диэтилбензимидазолия йодида.

В то же время, препарат сравнения Глутоксим оказывает значительно менее выраженное воздействие на экспрессию цитокинов, чем Стелланин и 1,3-диэтилбензимидазолия йодид, как при однократном, так и при курсовом применении.

ВЫВОДЫ

Подводя итог настоящему исследованию, необходимо сделать следующие выводы:

1. Препарат Стелланин (40 мг/кг) и его метаболит 1,3-диэтилбензимидазолия йодид (20 мг/кг) обладают выраженной противовирусной активностью в отношении вируса гриппа A/Aichi/1/68 (H3N2) при экспериментальной гриппозной инфекции в условиях их однократного двукратного перорального применения. Препараты снижают гибель экспериментальных животных до 30% и 40% соответственно против 70% гибели мышей в контрольной группе. В то же время, иммуностимулятор Глутоксим в его эффективной терапевтической дозе 10 мг/кг внутрибрюшинно снижал летальность животных лишь до 50 %.

Курсовое 8-дневное применение Стелланина (40 мг/кг, перорально) усиливает его протективное действие, снижая гибель животных до 10% против 70% в контрольной группе нелеченных животных. Напротив, терапевтическая активность Глутоксима при курсовом применении (10 мг/кг, внутрибрюшинно) резко снижается, и гибель животных при его использовании составляет 70%, как и в контрольной группе.

2. Препарат Стелланин (40 мг/кг) и его метаболит 1,3-диэтилбензимидазолия йодид (20 мг/кг) при двукратном однократном введении в высокой степени повышают иммунный статус экспериментальных животных при моделировании вирусной инфекции. Препараты значительно повышают уровень зрелых Т-лимфоцитов (CD3+), Т-хелперов/индукторов (CD4+), В-лимфоцитов (CD20+), а также иммуноглобулинов IgM и IgG, снижая при этом инфекционный титр вируса гриппа в легких экспериментальных животных. Т.е., препараты активируют как Th1-тип, так и Th2-тип иммунного ответа (клеточный и гуморальный иммунитет соответственно). Аналогичный иммуностимулирующий эффект Стелланина выражен и при его курсовом 8-дневном применении.

В то же время, препарат Глутоксим в значительной степени уступает иммуностимулирующей активности Стелланина и 1,3-диэтилбензимидазолия

йодида, не влияя на показатели уровня В-лимфоцитов (CD20+), а также иммуноглобулинов IgM и IgG и инфекционного титра вируса гриппа.

3. Препарат Стелланин (40 мг/кг) и его метаболит 1,3-диэтилбензимидазолия йодид (20 мг/кг) как при однократном, так и при 8-дневном курсовом применении значительно активируют экспрессию интерферонов и интерлейкинов. Причем активации подвергается экспрессия факторов, участвующих в развитии как Th1-типа иммунного ответа (клеточный иммунитет), так и Th2-типа иммунного ответа (гуморальный иммунитет). Активирующий эффект Стелланина усиливается при его курсовом применении.

В то же время, препарат сравнения Глутоксим оказывает значительно менее выраженное воздействие на экспрессию цитокинов, чем Стелланин и 1,3-диэтилбензимидазолия йодид, как при однократном, так и при курсовом применении.

Таким образом, полученные результаты позволяют судить о препарате Стелланин, как о высокоэффективном иммуностимуляторе, значительно превосходящем по специфической терапевтической активности препарат Глутоксим. Причем иммунотропное действие Стелланина опосредуется эффектами его физиологического метаболита 1,3-диэтилбензимидазолия йодида.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Лебедев К.А., Понякина И.Д. 1990. Иммунограмма в клинической практике. М.Наука: 86-94.
2. Можокина Г.Н., Елистратова Н.А., Михайлова Л.П., Куничан А.Д. 2002. Влияние глутоксима на формирование и течение туберкулезного воспаления у экспериментальных животных // Цитокины и воспаление. 4.
3. Шепелева В.В. 2009. Фармакологическое исследование ряда гистопротекторов растительного происхождения для профилактики и лечения осложнений химиотерапии. – Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. С.-Пб.: 22 С.
4. Нагоев Б.Р. Шубич и др. 1981. Лаб. дело. 4: 195-198.
5. Chomczynski P., Sacchi N. 1987. // Anal. Biochem. 162: 156-159.
6. Gaede K.I, Mamat U., Schlaak M. et al. 1999. // J. Mol. Med. 77, 12: 847-852.
7. Gelder C.M., Thomas P.S., Yates D.H. et al. 1995. // Thorax. 50: 1033-1037.
8. Harrison T. S., Levitz S.M. 1996. // J. of Immunol. 3: 4492-4497.
9. Lin Y., Zhang M., Barnes P.F. 1998. // Infection and Immunity. 66: 1121-1126.
10. Manchini C., Vaerman J.P. et al. 1964. Procides of biological fluids. Amsterdam: 370-379.
11. Yamamura M., Uyemura K., Deans R. J. et al. 1991. // Science. 254, 11: 277- 279.