

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН



ТАШКЕНТСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ

## МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

«СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ИММУННЫХ  
ПРЕЦИПИТИРУЮЩИХ СЫВОРОТОК ДЛЯ  
ПРИМЕНЕНИЯ В СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКОЙ  
ПРАКТИКЕ»



Ташкент 2019

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН

ТАШКЕНТСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ

«СОГЛАСОВАНО»

Начальник управления развития  
науки д.м.н., проф. Н.Л.Хабиллов

« 18 » 10 2019 г.

«УТВЕРЖДАЮ»

Начальник Главного управления  
науки и образования  
д.м.н., проф. У.С.Исмаилов

« 18 » 10 2019 г.

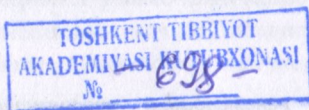


СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ИММУННЫХ ПРЕЦИПИТИРУЮЩИХ  
СЫВОРОТОК ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ  
В СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКОЙ ПРАКТИКЕ

(Методические рекомендации)

«Тасдиқланди»  
УзР Соғлиқни сақлаш  
вазирлиги илмий фаолиятини  
мувофиқлаштириш Бўлими

18. 10 2019  
№ 8к-п/423



Ташкент – 2019

## Основное учреждение разработок:

Ташкентская медицинская академия

### Составители:

И.И.Бахриев    заведующий кафедрой судебной медицины и медицинского права ТМА, к.м.н., доцент

Б.А.Чориев    соискатель кафедры судебной медицины и медицинского права ТМА, старший врач-специалист (судебно-медицинский эксперт) Центральной судебно-медицинской и патолого-анатомической лаборатории Министерства обороны РУз

### Рецензенты:

З.А.Гиясов    профессор кафедры судебной медицины и медицинского права ТМА, д.м.н.

Ш.И.Рузиев    доцент кафедры судебной медицины и медицинского права ТашПМИ, д.м.н.

Методические рекомендации рассмотрены и утверждены на заседании Ученого совета ТМА " 25 " Сентября 2019г. протокол № 3

Секретарь Учёного Совета



Г.А. Исмаилова

В методических рекомендациях изложены данные современной литературы и собственных исследований, подробно изложены традиционные и современные методы и схемы иммунизации животных, приведены классификации адъювантов, понятие естественно-научной систематики животного мира. Авторами предложена методика иммунизации животных позволяющая получить антивидовые антисыворотки с высоким титром.

*Методические рекомендации предназначены для врачей судебно-медицинских экспертов, преподавателей кафедры судебной медицины медицинских ВУЗов, студентов бакалавриатуры и магистратуры.*

## Введение

Судебно-медицинское исследование вещественных доказательств биологического происхождения имеет большое значение для успешного расследования и раскрытия тяжких преступлений, направленных против личности и здоровья граждан. В настоящее время для выполнения каждого вида анализа в большинстве судебно-медицинских лабораторий используется отдельная часть исследуемого объекта. При этом экспертами, выполняющими какой-либо вид биологических исследований, не учитываются потребности и особенности проведения иных видов анализа. Такой подход, может быть допустим, при наличии биологического материала в достаточном количестве. Однако, пятна крови и выделений, ткани человека, выявляемые на различных вещественных доказательствах, часто имеют малую величину. В таких случаях, при назначении биологической судебной экспертизы, а затем дополнительной – молекулярно-генетической, для более информативных исследований может просто не хватить биологического материала. С другой стороны, проведение только генетических исследований микрообъектов не всегда целесообразно, т.к. при отрицательном результате остается открытым вопрос, чем это вызвано: деградацией ДНК, потерей материала во время пробоподготовки или исследованием объекта, происходящего не от человека.

Определение вида крови проводится при помощи реакции преципитации. Для постановки реакции необходима преципитирующая сыворотка высокого титра. Обычно такая сыворотка получается путем иммунизации животных чужеродным белком. До настоящего времени наибольшим распространением пользуется метод повторной иммунизации. Этот метод малоэффективен для животных с низкой реактивностью и для них необходимо более сильное раздражение (2, 3, 13, 17, 20, 23).

Большинство иммунологических методов исследования предусматривают применение иммунных сывороток, получаемых из крови животных, иммунизированных различными антигенами (АГ), при этом их активность существенно влияет на результаты исследования. Для получения сывороток необходимо подобрать рациональную схему иммунизации животных, которая предусматривает физико-химическое состояние АГ, дозы, способы, интервалы и кратность введения АГ, общую продолжительность цикла иммунизации, применение адъювантов и иммуномодуляторов (4, 7, 8, 16, 19, 21).

Поиск и внедрение новых высокоэффективных адъювантов для получения преципитирующих сывороток по-прежнему представляет собой актуальную проблему. Ее решение позволит сократить число ревакцинаций,

что не только снизит антигенную нагрузку на организм, но также значительно упростит и удешевит сам процесс иммунизации домашних животных. К таким адъювантам предъявляют четкие требования: они должны значительно повышать иммуногенность вакцин и напряженность иммунитета, не обладать токсичностью и аллергенностью.

Алиева Е.В. соавторами (2008) указывают, что попытки иммунизации кроликов по схеме, состоящей из последовательных многоточечных внутрикожных введений АГ с полным адъювантом Фрейнда, приводили к иммунному ответу лишь у 25-30% иммунизируемых животных, при этом длительность иммунизации составляла 2,5-3 месяца, а у кроликов развивалась адъювантная болезнь. В дальнейшем в качестве иммуномодулирующего вещества применён феракрил (смесь железных (II, III) солей полиакриловой кислоты), который способен вызывать выраженное увеличение антителообразующих Т- и В-клеток. Изменена схема иммунизации: грундиммунизация включала пять последовательных парентеральных введений смеси АГ с 3% водно-спиртовым раствором феракрила с интервалами в 3-7 дней. Основной цикл иммунизации состоял из четырех внутривенных инъекций комплекса АГ-АТ через каждые 3-4 дня. При такой схеме иммунизации получили кроличьи гипериммунные сыворотки с высокой специфической активностью в иммунологических реакциях.

Берзина А.Г. соавторами (2013) иммунизировали кроликов внутривенно, вводя растворы антигена с адъювантом Фрейнда в соотношении 1:1 в объеме 1,0 мл в краевую ушную вену. Подкожные инъекции осуществляли в 8 точек вдоль хребта с обеих сторон, вводя препарат в объеме 0,25 мл в каждую точку. Предложенная авторами методика иммунизации животных позволяет получить антивидовые антисыворотки с высокими титрами.

Сенченко Б.С. и Гугушвили Н.Н. (2000) для получения преципитирующих сывороток определения видовой принадлежности кролику вводили подкожно 0,3 мл цельной крови и через 5 дней вновь этому же кролику вводили 0,5 мл цельной крови подкожно, затем аналогично по 0,7 и 0,9 мл. Через 5 дней после последней подкожной инъекции вводили внутримышечно 1 мл цельной крови в область бедра и три последних с интервалом 5 дней по 1,5 мл также внутримышечно. Антисыворотки, применяемые для реакции преципитации, обладали специфичностью, т.е. давали преципитат только с сывороткой того вида животного, кровью которого проводилась гипериммунизация.

Строганова И.Я. (2012) иммунизировала кроликов трижды с

интервалом 14 дней препаратом концентрированного вируса, обработанного ультразвуком с адьювантом Фрейнда 1:1 по 2 мл внутримышечно. Через две недели после последней иммунизации брали кровь, получали сыворотку и исследовали в РНГА и РН, титр антител составил  $10,05 \pm 0,07 \lg_2$  и  $5,38 \pm 0,16 \lg_2$  соответственно. Были подобраны биологические системы для получения специфических гипериммунных сывороток к РСВ КРС - бараны и кролики, на них получали сыворотки с титром антител в реакции нейтрализации  $6,08 \pm 0,09 \lg_2$  и  $5,38 \pm 0,16 \lg_2$ , которые и использовали в дальнейшей работе.

В судебно-медицинской практике для дифференцирования белка филогенетически близких видов животных при экспертизе пятен крови используют реакцию преципитации в жидкой среде. Применяют специальные дифференцирующие сыворотки, полученные иммунизацией животных каким-либо видом белка. Однако эти сыворотки не являются строго специфичными, они позволяют дифференцировать родственные виды белка только по скорости наступления реакции, которая в значительной степени зависит от концентрации белка-антигена в исследуемом пятне. Технические погрешности в определении количества белка, субъективная оценка времени появления преципитата, и некоторые другие факторы могут исказить результаты опыта [11].

В настоящее время часто применяемой реакцией для установления видовой принадлежности биологических объектов является реакция иммуноэлектрофореза, а также встречного иммуноэлектрофореза. Исследователи внесли в эту реакцию ряд существенных добавлений для удобства использования в практике. Данная реакция позволяет установить видовую принадлежность крови при разведении ее сыворотки 1:100000.

В.П.Ольховик (1967), а также В.В.Томилин и др. (1988) для определения видовой принадлежности биологических объектов предложили метод встречного иммуноэлектрофореза на ацетат целлюлозной пленке (ПАЦ), который, в последнее время, получил широкое распространение в судебно-медицинской практике.

В зарубежных странах для установления видовой принадлежности крови и других биологических объектов по IgG широко используется метод иммуноферментного анализа (ИФА) и реакция иммунофлюоресценции (РИФ) [1, 16].

Известно, что проведение РИФ возможно в трех основных вариантах: прямое окрашивание, не прямое окрашивание, не прямой метод с использованием комплемента. Для окрашивания препаратов использовали отечественные стандартные антивидовые люминесцирующие сыворотки

(ЛС) против глобулинов человека, кролика и барана, выпускаемых НИИ эпидемиологии и микробиологии АМН РФ им. Н.Ф.Гамалеи. Они представляют собой лиофилизированную глобулиновую фракцию иммунной сыворотки, связанную (конъюгированную) с флюорохромом флюоресцеин-изотиоцианатом (ФИТЦ).

Диагностическая ценность РИФ, по мнению многих исследователей, зависит от качества приготовленных цитологических препаратов, так как даже незначительные повреждения клеток могут вызвать изменения в параметрах их флюоресценции. Перечисленные в специальной литературе многочисленные методические приемы позволяют получить качественные цитологические препараты, которые являются малопригодными для изучения видовой дифференцировки изолированных клеток.

Это связано с тем, что в препаратах, приготовленных любым из способов, на поверхности клеток содержалась примесь крови или слюны, специфические белки которых выявлялись при помощи РИФ даже в очень больших разведениях и, несомненно, их люминесценция искажала или маскировала картину свечения клеток.

Одним из наиболее достоверных методов идентификации белков является полимеразная цепная реакция (ПЦР), с помощью которой на уровне генотипа можно определить видовую принадлежность любых тканей, сохранивших биохимическую структуру. В основе метода лежит детекция фрагмента ДНК, являющегося специфическим только для конкретного биологического объекта (14, 37, 39).

С помощью ПЦР можно определить не только видовую принадлежность белка, но и выявить примеси разных видов животных.

Благодаря высокой чувствительности и специфичности, хорошей воспроизводимости результатов, скорости и низкой трудоемкости процедур, ПЦР становится одним из наиболее достоверных методов при идентификации видовой принадлежности белка.

Судебно-медицинская экспертиза видовой принадлежности крови имеет значение в связи с преступлениями против личности, в охране и восстановлении фауны, рациональном ее использовании, в делах по хищению и незаконному убою животных, являющихся государственной, кооперативной и личной собственностью, в злоупотреблении продуктами животноводства, охоты и рыболовства, в борьбе с мучительством животных (15, 32, 34).

Наиболее частые объекты такой экспертизы - следы крови и продукты, ее содержащие. Редки экспертизы, в которых бы эти объекты сочетались с другими вещественными доказательствами (например, волосы, перья, кости),

помогающими в совокупности более точно определить вид животного. Между тем в постановлениях и определениях о проведении экспертизы вопросы о видовой принадлежности крови, как правило, конкретны.

Нет убедительных сведений о том, что в пределах рода особенности животных, составляющих его виды, отображены в свойствах их сыворотки крови, которые определяются в серологических реакциях, хотя вероятность этого не исключена. Имеются ориентировочные данные о слабо выраженных антигенных отличиях сывороток лисицы и корсака рода лисиц. Перед экспертом весьма редко ставится вопрос о различии по следам крови животных разных видов, входящих в один род. Поэтому для практики существенное значение имеет возможность дифференцирования крови на уровне рода, а также более крупных таксономических единиц (12, 18, 19, 24, 25).

Определение видовой, родовой и другой принадлежности следов крови, медико-биологическое направление деятельности эксперта, предполагающей освоение им элементов биологических знаний. Необходимость таких знаний и, в первую очередь, об естественно-научной систематике (ЕНС) животного мира, обусловлена характером вопросов к эксперту сводящихся, как правило, к определению видовой принадлежности следов крови. Нет животного вне вида и вида вне ЕНС. Эксперт-биолог должен знать основы ЕНС, которые он может усвоить самостоятельно из общедоступных научных руководств, монографий и учебников, и пользоваться этими пособиями в экспертизах таксономической принадлежности следов крови.

Между соотношением положения животных в систематике и антигенными свойствами фракций их сывороточных белков связь непрямая. Эволюционное изменение антигенных детерминант этих фракций протекало с неодинаковой быстротой. В разных группах животных отмечена неравномерная эволюционная скорость возникновения антигенного полиморфизма тех или иных сывороточных белков. Сывороточные белки у животных, таксономически более отдаленных, иногда проявляют сходные антигенные признаки не менее четко, чем у животных таксономически близких. Помимо этого, сыворотки неродственных животных обладают общими, гетерогенными антигенами. Однако свойства сывороточных белков, выражающиеся в антигенной обособленности животных тех или иных таксономических единиц, позволяют в практике осуществлять дифференциацию следов крови.

Биологические познания также необходимы эксперту для понимания совокупности вопросов, относящихся к иммунологическому релятивизму. Суть его заключается в иммунологической закономерности, выражающейся в



том, что выработка антител зависит от соотносительного положения в ЕНС иммунизируемого животного и животного, чья сыворотка используется как антиген. Чем дальше отстоят животные в ЕНС, тем шире спектр образующихся антител и выше их титр. Все судебно-медицинские диагностические сыворотки, за исключением антикроличьей, изготавливают иммунизацией кроликов. Эксперт располагает сыворотками, чьи антитела выработаны животным, занимающим определенное положение в классе млекопитающих, по отношению к антигенам крови человека и животных, равноудаленных в таксономическом отношении от кролика. Это находит непосредственное отражение в свойствах диагностических сывороток. Если бы в качестве продуцента антител был использован не кролик, а другое млекопитающее, то характеристика диагностических сывороток была бы иной. Изготовление преципитирующих сывороток на птицах, чьи белки крови не имеют общих антигенных детерминант с белками крови млекопитающих, по-видимому, позволило бы получить более равноценные в диагностическом отношении сыворотки. Проявления иммунологического релятивизма следует учитывать как при изготовлении преципитирующих сывороток, так и при их применении и толковании полученных результатов. Следовательно, материальной основой иммунологического релятивизма, его источником является различие между животными, отображенное в ЕНС. Поэтому ЕНС - основа экспертизы вида крови.

Осмысление экспертом результатов, их оценка осуществляются с учетом совокупности необходимых медицинских и биологических сведений. Экспертиза таксономической принадлежности крови полноценна, когда опытные данные, полученные в результате исследования вещественного доказательства, опосредованы экспертом через ЕНС в выводах заключения, т. е. когда достигнуто конкретное сочетание элементов практики и теории. Именно на этом этапе эксперт устанавливает, с какой таксономической категорией нужно соотнести результаты исследования пятна крови: видом, родом, семейством, отрядом или классом.

Термин «филогенетически близкие виды животных», получивший распространение в судебно-медицинской литературе, нельзя признать удачным в силу следующего. Судебно-медицинские эксперты не располагают столь глубокими познаниями в биологии, в частности в области эволюции, чтобы доказать и отстоять в судебном заседании правильность своего вывода о степени «филогенетической» близости или отдаленности видов животных. Это требует специального образования. Филогенетическое родство животных - сложное многофакторное понятие эволюционной биологии, которое недостаточно изучено и служит предметом дискуссий

биологов. Родственные серологические реакции являются лишь одним из вспомогательных, но не основных способов доказательства филогенетических связей животных. Изученность этих реакций ничтожна. Эксперт в своей работе может практически пользоваться только ЕНС, которая включает выводы науки о степени филогенетического родства животных.

Вместо термина «филогенетически близкие виды» более целесообразно использовать для экспертных целей термин «таксономически близкие виды» [12].

Для иммунизации животных предложено много разных способов. До настоящего времени наибольшим распространением пользуется метод повторной иммунизации, предложенный Райским. Однако работы исследователей показали, что повторная иммунизация вызывает выработку преципитинов высокого титра лишь у небольшого числа животных. Для животных с низкой реактивностью этот метод малоэффективен, поэтому необходимо более сильное раздражение, чем обычная ревакцинация. Метод активизации антителообразовательной функции ретикулоэндотелиальной системы известен в литературе. Авторы указывают, что парэнтеральное введение цитотоксической антиретикулоэндотелиальной сыворотки, даже в малых дозах, ведет к повышению титра антител. Но использование этого метода в судебно-медицинской практике для получения преципитирующих сывороток высокого титра непригодно, так как сама цитотоксическая сыворотка обладает антигенными свойствами, вследствие чего возможно образование неспецифических преципитинов [11].

Как полагает Т.Чард (1981), одна и та же конечная цель может быть достигнута различными путями, но в любом случае, схема иммунизации, предлагаемая для производства, должна соответствовать определенным требованиям, главное из которых - возможность получения сывороток с достаточно высоким титром специфических антител за сравнительно короткий промежуток времени при минимальном расходе антигенного и другого материала.

В.Я.Карякин (1950) отмечал эффективность повторной иммунизации с предварительным введением животным больших доз сахара и железа. Но применяемая автором доза плохо переносилась кроликами: часть их погибла в связи с введением раздражителя.

За последнее десятилетие разработано и клинически оценено большое число иммуномодулирующих препаратов. Их использование в терапии инфекционных и опухолевых заболеваний стало во многом стандартной процедурой. Как показали исследования, эффективными

иммуномодуляторами и адьювантами являются вещества, полученные методами химического синтеза. Такие препараты обладают известным составом и строением и, как следствие, воспроизводимостью структуры и минимальным количеством примесей.

В мире разрабатывается иммунологическая защита от ряда вредных химических соединений: канцерогенов, мутагенов, тератогенов и лекарств в случае их передозировки. В области наркологии работы ведутся для изучения возможности лечения отравлений наркотиками введением специфических антител, а также лечения и профилактики наркотической зависимости путем вакцинации специфическими антителами к наркотикам [5, 26, 29, 30, 31].

В настоящее время известны десятки веществ органической и неорганической природы, которые способны оказывать адьювантное действие.

Адьюванты (лат. *adjuvantis* - помогающий, способствующий) - вспомогательные факторы различного происхождения и различной химической природы, оказывающие неспецифическое стимулирующее действие на иммунный ответ при совместном их применении со специфическими антигенами или, другими словами, вещества, повышающие иммунный потенциал вакцин [9, 22, 36, 39].

В качестве адьювантов используют минеральные соединения (гели гидрата окиси и фосфата алюминия), полимерные вещества, сложные химические смеси (липополисахариды, белково-липополисахаридные комплексы, мурамилдипептид и его производные и др.); бактериин и компоненты бактерий (вытяжки вакцины БЦЖ); липиды и эмульгаторы (ланолин, арлацел); вещества, вызывающие воспалительную реакцию (сапонин, скипидар) и другие [28, 33, 35].

Как видно, адьюванты имеют различный химический состав и происхождение, сходство их состоит в том, что все они способны усиливать иммуногенность антигена, изменять степень гуморального ответа на иммуноген, являясь при этом чужеродными для организма веществами.

Единой классификации адьювантов по настоящее время не существует. Они могут быть разделены в зависимости от их происхождения, механизма действия и физико-химических свойств. Согласно данной классификации адьюванты представлены тремя группами: (I) вещества, выступающие в роли активных иммуностимуляторов, которые повышают иммунный ответ организма на введенный антиген; (II) иммуногенные белки, которые служат носителями и при этом вызывают Т-клеточный ответ, (III) адьюванты транспортного средства (масла, липосомы), которые являются матрицей для антигенов, они также стимулируют иммунный ответ [14, 38].

Другая классификация делит вспомогательные вещества на минеральные добавки, соли алюминия и подобные, бактериальные производные, поверхностно-активные вещества, транспортные средства и препараты, способствующие более медленному освобождению материалов или цитокинов [17].

Авторы предлагают систему классификации, которая разделяет адьюванты на группы: адьюванты на основе геля, поверхностноактивные вещества, бактериальные продукты, масляные эмульсии, белки или липопептиды [29].

Также известно большое количество веществ, которые способны оказывать адьювантное действие на различные антигены. В качестве адьювантов используются убитые микроорганизмы (микобактерии, коринебактерии, нокардии и др.), органические вещества (бактериальные полисахариды и липополисахариды, лецитин, холестерин, ланолин, агар, глицерин, желатин, крахмал, пектины, протамины и др.), неорганические вещества (гидроксид алюминия, фосфат алюминия, хлорид кальция, фосфат кальция, гидроксид железа, аммониевокальциевые квасцы, минеральные масла и др.), синтетические вещества (нуклеотиды, полианионы и др.). Кроме простых адьювантов, используют сложные, представляющие собой смеси липидов с минеральными сорбентами, масел с липополисахаридами и эмульгаторами, микроорганизмов с маслами, и другими веществами. Из сложных адьювантов наиболее известен адьювант Фрейнда.

Адьюванты действуют как на антиген - через изменение свойств антигена, так и на организм путём стимуляции функций иммунной системы последнего [34, 37].

Под влиянием адьювантов изменяется структура антигена, его молекулярная масса, полимерность, растворимость и другие физико-химические параметры. Действие на антиген сводится к превращению растворимых антигенов в корпускулярные, благодаря укрупнению его молекулы (сорбция, химическая связь с полимерным носителем). В результате антиген лучше захватывается и активнее представляется фагоцитирующими и другими иммунокомпетентными клетками, т.е. превращается из тимусзависимого в тимуснезависимый антиген. Кроме того адьюванты вызывают на месте инъекции воспалительную реакцию с образованием фиброзной капсулы, гранулемы, которая может существовать длительное время. В результате последнего антиген длительно сохраняется, депонируется на месте инъекции и медленно выводится из «депо». Длительное представление антигенов создает более выраженный иммунный ответ и более длительную память. При этом важное значение имеет

стабильность самого антигена на протяжении всего этого времени.

Второй основной механизм действия адъювантов основан на неспецифическом иммуностимулирующем действии. Он сводится к увеличению продукции клетками организма соответствующих цитокинов, экспрессии молекул взаимодействия. Адъюванты усиливают реакции со стороны лимфатических узлов, активируют систему комплемента, стимулируют пролиферацию, дифференцировку и функциональную активность Т- и В-клеток, образование цитокинов, усиливают синтез защитных белков организма [32].

Адъюванты используют для усиления иммунного ответа в здоровом организме, для вакцинации и в лабораторной практике для иммунизации животных. Наиболее важным достоинством любого адъюванта является то, что при совместном с ним введении антигена создается более напряженный и продолжительный иммунитет, снижается токсичность вакцины и создается так называемое депо антигенов в организме вакцинированного. Поиск и внедрение новых высокоэффективных адъювантов позволил сократить число ревакцинаций, снизить антигенную нагрузку на организм, значительно упростить и удешевить сам процесс вакцинации [15, 27, 32].

Адъюванты, как правило, делятся на две группы: средства доставки и иммуностимуляторы с некоторыми общими компонентами. Средства доставки - это, как правило, частицы (минеральные соли, например, гидроксид алюминия, эмульсии, липосомы). Они несут и "показывают" клеткам выбранные антигены в множестве копий, имитируя естественную презентацию микроорганизмами и используются для осаждения антигенов в месте введения или увеличения его доставки в APC (микро- и наночастицы) [7, 19]. В противоположность этому, иммуностимуляторы (агонисты TLR, сапонины, цитокины...) непосредственно узнают и активируют клетки иммунной системы и усиливают иммунный ответ на антигены. В этой группе адъювантов вещества, нацеленные на рецепторы распознавания патогенна (РРП) врожденной иммунной системы получили значительное внимание в течение последнего десятилетия.

Адъюванты на основе алюминия являются наиболее распространенным адъювантом и используются в утвержденных профилактических вакцинах из-за его высокой безопасности и способности усиливать защитный гуморальный иммунный ответ. В настоящее время признается, что соединения алюминия, как и многие другие адъюванты, действует путем прямой активации клеток, иммунной системы.

Алюминий является наиболее часто используемым вакцинным адъювантом, и до недавнего времени, он был единственным адъювантом,

лицензированным для использования в США [21, 23, 25, 35]. При его отсутствии антигенные компоненты большинства вакцин (за исключением живых ослабленных вакцин) не в состоянии запустить адекватный иммунный ответ [24, 35]. Как это ни парадоксально, несмотря на то, что алюминиевые адъюванты широко используются на протяжении почти 90 лет, их точный механизм действия остается недостаточно понятным. Кроме того, во все большем числе исследований выясняется, что использование алюминиевых адъювантов может вызывать серьезные аутоиммунные последствия у людей [16, 25, 26, 35].

Иммунизация кроликов сывороточными белками человека и животных, обработанные формалином позволяет получить преципитирующие сыворотки высокого титра и специфичности. Обладая высокой реакционной способностью, формалин при смешивании его с сывороткой вступает в реакцию с сывороточными белками и приводит к образованию молекулярных комплексов, достаточно крупных по размерам и устойчивых к воздействиям гидролитических ферментов.

Ряд авторов считает, что формальдегид является естественным компонентом человеческого организма, используемый для синтеза тимидиновых, пуриновых и других кислот, образуется в печени при действии микросомальной диметилазы, при биотрансформации дигалоидпроизводных метана и метилметакрилата [5]. При попадании в кровь через ряд ферментативных превращений в печени окисляется до муравьиной кислоты, одновременно в печени образуется метиловый спирт (реакция дисмутации). Далее муравьиная кислота метаболизируется под действием форматдегидрогеназы до  $\text{CO}_2$  или вовлекается в систему тетрагидрофолиевой кислоты в обмен одноуглеродных остатков. Формальдегид легко взаимодействует с белками, аминами, амидами, нуклеопотеидами, нуклеиновыми кислотами. Часть формальдегида, которая не подвергается биотрансформации, быстро проникает в органы и ткани [7, 22].

Имунофан (Imunofan) - синтетический гексапептид тимуса ( $\text{C}_{36}\text{H}_{61}\text{O}_{10}\text{N}_{12}$ ), производное фрагмента молекулы гормона тимопоэтина (аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинин). Препарат увеличивает продукцию интерлейкина-2 и иммуноглобулинов, способствует восстановлению клеточного и гуморального иммунитета у животных, обладает адъювантной активностью.

Полиоксидоний (Polooxidonium) является сополимером N-оксидированного производного полиэтиленпиперазина 1,4-этиленпиперазина и [M-карбоксиэтил]-1,4-этиленпиперазиния бромидом].

Препарат воздействует на функциональную активность цитокинов, продуцируемых клетками моноцитарно-макрофагальной системы. По данным экспериментов *in vivo*, совместное введение Полиоксидония с низкими дозами антигена усиливает процесс антителообразования в 5-10 раз. Препарат обладает выраженной детоксикационной активностью за счет повышения устойчивости мембран клеток к цитотоксическому воздействию лекарственных препаратов и химических веществ.

Ронколейкин [Roncoleukinum] представляет лекарственную форму рекомбинантного интерлейкина-2 человека, выделенного и очищенного из клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Спектр фармакологических свойств препарата включает направленное воздействие на дифференцировку и активацию Т- и В-лимфоцитов, моноцитов, макрофагов, олигодендроглиальных клеток, эпидермальных клеток Лангерганса. Ронколейкин активирует синтез всех изотипов иммуноглобулинов и выработку интерферонов. Препарат применяется в ветеринарной практике в качестве адъюванта вакцин.

Сальмозан [Salmosanum] относится к иммуномодуляторам бактериального происхождения. Действующим веществом является полисахаридный компонент О-соматического антигена сальмонелл. Функциональная активность Сальмозана заключается в стимулировании клеточного и гуморального иммунитета, активации макрофагов, интерлейкинов [ИЛ-1, ИЛ-12]. Препарат проявляет адъювантную активность и способен стимулировать клеточный и гуморальный иммунитет.

Фоспренил [Fosprenil] применяется в качестве противовирусного и иммунокорректирующего средства. Препарат получен в результате фосфорилирования хвойных полипrenoлов - полиизопреноидных спиртов, относящихся к классу терпеноидов. Полипrenoлы и их фосфорилированные соединения являются интегральными компонентами биологических мембран клеток всех живых организмов. Спектр активности Фоспренила включает стимуляцию продукции ИЛ-1, индукцию ранней выработки ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-12 и фактора некроза опухоли [ФНО].

Несмотря на экспоненциальный рост количества адъювантов, которые изучаются в лабораториях мира, для использования на людях разрешены только единичные препараты. При сравнении адъювантного эффекта было обнаружено, что только гидроокись алюминия стимулировала выработку высокоаффинных антигенспецифических иммуноглобулинов класса G на столь же высоком уровне, как и полный адъювант Фрейнда.

Отдельно следует отметить, что на фоне введения адъюванта Фрейнда и гидроокиси алюминия наиболее отчетливо обнаруживалась интересная

закономерность. По большинству исследуемых показателей применение смеси рекомбинантных полипептидов сопровождалось усилением иммунного ответа по сравнению с иммунизацией монопрепаратами. Таким образом, адъювантный эффект ИЛ-1 $\beta$  в отношении овальбумина был наименьшим по сравнению с полным адъювантом Фрейнда и гидроокисью алюминия.

Качество поствакцинального иммунного ответа или уровень выработки антител будут зависеть от нескольких факторов, в том числе способа, числа и времени введения вакцины, от природы антигена и качества презентации антигена. Весь этот процесс облегчается адъювантами. Действительно, адъюванты позволяют преодолеть слабо иммуногенные свойства большинства белков, пептидов и ДНК-вакцин (не имеющих природных иммунных триггеров) или индукцию неадекватного иммунного ответа. Адъюванты могут быть использованы для [37] ориентирования иммунного ответа за счет модуляции баланса Th1/Th2 и снижения количества антигена и инъекций, необходимых для индукции защиты [12, 26].

Таким образом, количественные и качественные показатели специфических сывороток во многом определяются иммуногенностью антигена, видовыми и индивидуальными характеристиками животных-продуцентов, эффективностью используемой схемы иммунизации и правильным выбором адъюванта. Однако достижению желаемого баланса этих факторов препятствует отсутствие модели, адекватно повторяющей все особенности иммунного ответа, подверженного воздействию разнообразных случайных факторов. В частности, практически не поддается учету и точной оценке важное и, возможно, преобладающее в некоторых случаях значение условий содержания продуцентов специфических сывороток. Как правило, фактические материалы по указанным вопросам не получают должной статистической оценки и остаются в рамках предположений даже в тех случаях, когда они представляются наиболее вероятными.

#### **Материалы и методы исследования.**

Настоящая работа посвящена разработке методики получения диагностической иммунной сыворотки преципитирующей белок человека и животных для использования в судебно-медицинских целях. В данной работе планируется разработать методику иммунизации кроликов и производство иммунных сывороток преципитирующие белок человека и животных с высоким титром (1:10000) и видовой специфичностью. Такая необходимость возникла потому, что иммунные преципитирующие сыворотки до настоящего времени приобретаются в Российской Федерации за валюту.

Для решения данной проблемы нами было проведено исследование по отношению иммунизации кроликов смесью 1%, 5% и 10% формалина и



сыворотки человека и животных. Иммунизация кроликов проводилась по схеме предложенной Л.И.Ломовицкой (1977) в модифицированном варианте по Д.Д.Джалалову и Р.А.Хасанову (1997).

В опытах использованы 48 кроликов обоего пола породы Шиншилла (Рис. 1) и Великан (Рис. 2), массой 3-3,5 кг. Животные содержались в стандартных условиях в соответствии с требованиями методического пособия «Правила и методы работы с лабораторными животными при экспериментальных микробиологических и иммунологических исследованиях». В качестве подстила использовались опилки из хвойных пород деревьев. Комбикорм и сочные корма для животных давались в клетки. Данные о составе и качестве корма хранятся в документации лаборатории. Животным давалась очищенная вода. Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды (20-22°C и относительной влажности воздуха 50-70%). В помещениях для содержания животных поддерживался 12-14 часовой цикл освещения. Температура и влажность воздуха регистрировались ежедневно. Никаких существенных отклонений этих параметров в период акклиматизации и в ходе эксперимента не произошло. Клинический осмотр каждого животного проводили ежедневно. Выполняли тщательный осмотр животного в клетке содержания. Фиксировали общее состояние животных; особенность поведения, интенсивность, характер двигательной активности, наличие и характер судорог; координацию движений, тонус скелетных мышц; частоту, глубину дыхательных движений; состояние волосяного, кожного покрова; количество и консистенцию фекальных масс. В качестве антигена для иммунизации кроликов (Рис. 3) использованы смесь сыворотки крови человека (1-я группа), рогатого скота (2-я группа), птицы (3-я группа), лошади (4-я группа) и 10% раствор формалина в соотношении 1:1, которая сохранялась в холодильнике при температуре 4-6°C в течении 72 часов. В качестве контроля к каждой группе иммунизация кроликов по 2 штуки (всего 8 шт.) производилась сыворотками соответствующих видов и 0,9% физиологического раствора (5-я группа).

Антиген вводится в краевую вену уха кролика трехкратно, интервалом 1 день в объеме 1 мл/кг веса кролика. Проба крови у иммунизированных животных берётся на 4-й, 7-й и 9-й день после последней инъекции. При наличии преципитинов в сыворотке кроликов титром 1:5000 и 1:10000 производится забор крови пункцией полости сердца и кровопусканием. После иммунизации, если титр преципитирующих сывороток не достигал рабочего титра, то проводилась реиммунизация через две недели после последней иммунизации, однократным введением антигена.



Рис. 1



Рис. 2



Рис. 3

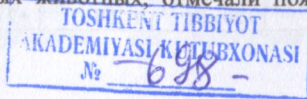
**Отбор крови и получение сыворотки.** Забор крови осуществлялся из краевой вены уха кролика (перед процедурой взятия крови ухо обрабатывали спиртом). Кровь ставили в термостат при температуры  $37^{\circ}\text{C}$  на 1 ч. (для отделения сыворотки). После проводили отбор сыворотки путем центрифугирования при 3000 об/мин в течение 10 минут. При необходимости

время центрифугирования увеличивали. Сыворотки хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$  в смеси 3% борной кислоты в соотношении 3 мг/1 мл.

**Результаты исследования и обсуждение.** Введение сыворотки крови человека, а также животных и 10% раствора формалина в соотношении 1:1 в объеме 1 мл/кг веса кролика приводила к иммунному ответу лишь у 70% иммунизируемых животных после первичной иммунизации, а при введении сыворотки крови птицы процент животных с иммунным ответом достигал 75-78. После реиммунизации положительный результат был достигнут соответственно в 90% и 95%. При этом длительность иммунизации составляла 22 дня, титр полученных иммунных преципитирующих сывороток достигал 1:10000, смертельных случаев у кроликов не наблюдалось.

При такой схеме иммунизации были получены кроличьи гипериммунные сыворотки преципитирующие белок человека, рогатого скота, птицы и лошади с высокой специфической активностью в иммунологических реакциях. При этом иммуностимулирующий эффект при отсутствии токсического воздействия на животное, без возникновения адьювантной болезни, достигался у 90-95% кроликов.

После первого введения антигенов внешний вид животных из опытных групп ничем не отличался от внешнего вида животных из контрольной группы. После второго введения было замечено небольшое снижение аппетита и подвижности животных. После третьего введения антигенов на месте инъекции, у некоторых животных, отмечали появление гиперемии, учащение сердцебиения.



После реиммунизации поведение опытных животных сохранялось таким же вялым по сравнению с контрольными животными, но серьезных изменений в поведении и внешнем виде не наблюдалось.

После забора крови (Рис. 4) приступают к определению титра и специфичности полученных сывороток. Преципитирующая сыворотка считается годной для судебно-медицинских исследований, если она имеет титр 1:10000, т. е. когда при добавлении ее к гомологичной нормальной сыворотке (Рис. 5), разведенной в 10000 раз, осадок выпадает в пределах 10 минут и она не дает осадков нормальными изосыворотками других видов, разведенными в 1000 раз в пределах одного часа.



Рис. 4

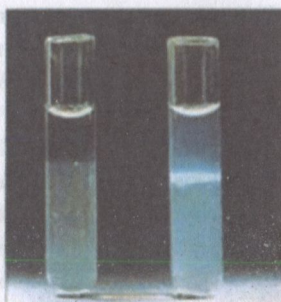


Рис. 5

Таблица №1

**Титр и особенности специфичности преципитирующих иммунных сывороток**

Группы	Титр/Время преципитации		Контрольная группа		Специфичность
	Титр	Время	Титр	Время	
1-я: антиген человека (10 шт.)	1:100 (10)	+40 сек.	1:100	+3 мин.	Отсутствие осадков к одному часу с разведенными в 1000 раз нормальными сыворотками крови рогатого скота, лошади, птицы
	1:1000 (10)	+1 мин.	1:1000	+6-8 мин.	
	1:5000 (9)	+3 мин.	1:5000	+10-15 мин.	
	1:10000 (7)	+6-8 мин.	1:10000	-	
2-я: антиген	1:100	+20 сек.	1:100	+2 мин.	Отсутствие осадков

рогогатого скота (10)	1:1000	+50 сек.	1:1000	+5-6 мин.	к одному часу с разведенными в 1000 раз нормальными сыворотками крови человека, лошади, птицы
	1:5000 (9)	+2 мин.	1:5000	+15-20 мин.	
	1:10000(8)	+4-6 мин.	1:10000	-	
3-я: антиген птицы (10)	1:100	+10-12 сек.	1:100	+1 мин.	Отсутствие осадков к одному часу с разведенными в 1000 раз нормальными сыворотками крови человека, рогатого скота, лошади
	1:1000	+40 сек.	1:1000	+4-6 мин.	
	1:5000 (10)	+1 мин.	1:5000	+10-12 мин.	
	1:10000 (9)	+3-5 мин.	1:10000	-	
4-я: антиген лошади (10)	1:100 ( )	+30 сек.	1:100	+2 мин.	Отсутствие осадков к одному часу с разведенными в 1000 раз нормальными сыворотками крови человека, рогатого скота, птицы
	1:1000	55 сек.	1:1000	+4-6 мин.	
	1:5000 (9)	+2 мин.	1:5000	+12-15 мин.	
	1:10000 (8)	+4-6 мин.	1:10000	-	

Из таблицы видно, что титр антител в первой группе в 9 случаях соответствовал 1:5000 и в 7 случаях 1:10000. Во второй группе в 9 случаях соответствовал 1:5000 и в 8 случаях 1:10000, в третьей группе в 10 случаях соответствовал 1:5000 и в 9 случаях 1:10000, в четвертой группе в 9 случаях соответствовал 1:5000 и в 8 случаях 1:10000.

Установлено, что все полученные преципитирующие сыворотки были специфичными, т.е. в разведении 1:1000 в течение 1-го часа реакции преципитации, кроме соответствующего вида, с другими антигенами не происходило.

Благодаря применению иммуностимулирующего действия 10% формалина значительно сокращены длительность процесса иммунизации (22 дня) и получение высоко специфической сыворотки, при этом повышен выход целевого продукта за счет увеличения антителообразования у животных с одновременным уменьшением трудозатрат. Также нужно отметить, что однократной реиммунизацией удалось увеличить процент положительных результатов в 90-95% случаях.

**Выводы.** Таким образом, по результатам исследования разработаны эффективные схемы иммунизации для получения гетероиммунных

сывороток, основанные на оптимальной комбинации белковых антигенов в комплексе с 10% раствором формалина, обеспечивающим высокий иммунный ответ у 90-95% животных, значительное сокращение сроков иммунизации, материальных и трудовых затрат.

Полученные гетероиммунные сыворотки являются высокоспецифическими и считаются пригодными для применения в судебно-медицинской практике.

Иммунный ответ (титр)	Сыворотка, полученная из смеси антигенов		
	1-2 нед.	3-4 нед.	5-6 нед.
1:1000 (10)	1:1000 (10)	1:1000 (10)	1:1000 (10)
1:10000 (100)	1:10000 (100)	1:10000 (100)	1:10000 (100)
1:100000 (1000)	1:100000 (1000)	1:100000 (1000)	1:100000 (1000)
1:1000000 (10000)	1:1000000 (10000)	1:1000000 (10000)	1:1000000 (10000)
1:10000000 (100000)	1:10000000 (100000)	1:10000000 (100000)	1:10000000 (100000)
1:100000000 (1000000)	1:100000000 (1000000)	1:100000000 (1000000)	1:100000000 (1000000)
1:1000000000 (10000000)	1:1000000000 (10000000)	1:1000000000 (10000000)	1:1000000000 (10000000)
1:10000000000 (100000000)	1:10000000000 (100000000)	1:10000000000 (100000000)	1:10000000000 (100000000)
1:100000000000 (1000000000)	1:100000000000 (1000000000)	1:100000000000 (1000000000)	1:100000000000 (1000000000)
1:1000000000000 (10000000000)	1:1000000000000 (10000000000)	1:1000000000000 (10000000000)	1:1000000000000 (10000000000)
1:10000000000000 (100000000000)	1:10000000000000 (100000000000)	1:10000000000000 (100000000000)	1:10000000000000 (100000000000)
1:100000000000000 (1000000000000)	1:100000000000000 (1000000000000)	1:100000000000000 (1000000000000)	1:100000000000000 (1000000000000)
1:1000000000000000 (10000000000000)	1:1000000000000000 (10000000000000)	1:1000000000000000 (10000000000000)	1:1000000000000000 (10000000000000)
1:10000000000000000 (100000000000000)	1:10000000000000000 (100000000000000)	1:10000000000000000 (100000000000000)	1:10000000000000000 (100000000000000)
1:100000000000000000 (1000000000000000)	1:100000000000000000 (1000000000000000)	1:100000000000000000 (1000000000000000)	1:100000000000000000 (1000000000000000)
1:1000000000000000000 (10000000000000000)	1:1000000000000000000 (10000000000000000)	1:1000000000000000000 (10000000000000000)	1:1000000000000000000 (10000000000000000)

Установлено, что все полученные гетероиммунные сыворотки были специфичными, т.е. в реакции 1:1000 в течение 1-2 нед. реакции не происходили, кроме соответствующего антигена с другим типом антигена.

Важнейшим преимуществом гетероиммунных сывороток является то, что они обеспечивают высокую специфичность реакции в течение 1-2 нед. реакции.

Важнейшим преимуществом гетероиммунных сывороток является то, что они обеспечивают высокую специфичность реакции в течение 1-2 нед. реакции.

Важнейшим преимуществом гетероиммунных сывороток является то, что они обеспечивают высокую специфичность реакции в течение 1-2 нед. реакции.

## Литература:

1. Алексеев Ю.Д., Савенкова Е.Н. Общие принципы постановки реакции иммунофлюоресценции для определения видовой принадлежности изолированных клеток животного происхождения. 2013.
2. Алиева Е.В., Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н. и др. Опыт получения иммунных сывороток для производства диагностических препаратов. //Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». 2008, №1. С. 11-15.
3. Афанасьев Е.Н., Тюменцева И.С. Разработка новых подходов к получению гипериммунных сывороток для производства медицинских иммунобиологических препаратов. //Проблемы особо опасных инфекций, вып. 103, 2010. С. 67-69.
4. Берзина А.Г., Гамалея Н.Б., Капанадзе Г.Д. Методические подходы к получению антивидовых антисывороток с целью их использования в иммунофармакологических исследованиях. // Биомедицина. 2013. №2. С. 95-102.
5. Гамалея Н.Б., Берзина А.Г. Вакцины от наркотиков - новое перспективное направление профилактики злоупотребления ПАВ. //Биомедицина. 2011. №10. С. 70-83.
6. Д.Д.Джалалов, Р.А.Хасанов. Способ получения преципитирующих сывороток. //Расмий ахборотнома. 1997, №1, С. 61.
7. Исаенко Е.Ю., Бабич Е.М., Елисева И.В. и др. Адьюванты в современной вакцинологии. //ГУ «Институт микробиологии и иммунологии им. И.И.Мечникова Национальной академии медицинских наук Украины». 2013, N 4.
8. Карякин В.Я., Влияние ретикулоэндотелиальной системы на выработку преципитинов. //Дис ... канд.наук. Саратов, 1950.
9. Козлов В.Г., Хапчаев Ю.Х., Ишмухаметов А.А. Применение препаратов Имунофан, Полиоксидоний, Ронколейкин, Сальмозан и Фоспренил для потенцирования гуморального иммунного ответа у кроликов-продуцентов энтеровирусных диагностических сывороток. //Эпидемиология и вакцинопрофилактика 2016, №4, 89.
10. Ломовицкая Л.И. Изготовление сывороток анти-Gc на основе производства кроличьих сывороток, преципитирующих белки крови человека //Судебно-медицинская экспертиза. 1977, №1, С. 55-57.
11. Младзиевская Ю.А., Решетова Г.Н. Диагностические сыворотки фемидастера – иммунобиологические препараты для комплексного анализа микрообъектов судебно-биологической экспертизы. //Медицина экстремальных ситуаций. 2012. - №4. - С. 98-102.
12. Потапов М.И., Сигал Е.Р. Значение биологических знаний в экспертизе видовой принадлежности крови. //Судебно-медицинская

экспертиза. 1978, №1, С. 22-26.

13. Сенченко Б.С., Гугушвили Н.Н. Способ получения преципитирующих сывороток для определения видовой принадлежности мяса домашних и диких животных. //Патент №А61К39/395. 2000 г.

14. Серегин И.Г., Комарова И.Н., Валихов А.Ф. Применение ДНК-методов для идентификации пищевых продуктов. //Мат. 2-й Международной научной конференции «Живые системы и биологическая безопасность населения». М.: МГУПБ, 2003, С. 57-58.

15. Сулейменова Г.М. Сравнительная оценка новых методов дифференцирования крови филогенетически близких видов животных. //Судебно-медицинская экспертиза. 1977, №2, С. 38-40.

16. Сидиров В.Л., Ягмуров О.Д. Опыт использования иммуноферментного анализа при установлении видовой принадлежности крови на вещественных доказательствах. //Ученые записки СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова. 2013. Том XX. №3. – С. 61-62.

17. Грынкина И.А. О получении преципитирующих сывороток высокого титра для установления видовой принадлежности крови. //Вопросы судебно-медицинской экспертизы. Сборник статей. Москва, 1954, С. 425-427.

18. Чард Т. Радиоиммунологические методы. – М.: Мир, 1981. – 246 с.

19. Aguilar J. C. et al. Vaccine adjuvants revisited. //Vaccine. - 2007. - № 25. - P. 3752-3762.

20. Allison A.C. et al. Immunological adjuvants: desirable properties and side-effects. //Mol. Immunol. - 1991. - № 28. -P. 279-284.

21. Antu K Dey Novel Adjuvants and delivery systems for enhancing immune responses induced by immunogens. //Expert Review of Vaccines. - 2011. - Vol. 10, № 2. - P. 227-251.

22. Agmon-Levin. N., Blank, M., Shoenfeld Y. Adjuvants and autoimmunity. //Lupus. 2009, 18(13). 1217-1225.

23. Byars N.E. et al. Immunologic adjuvants: general properties, advantages, and limitations. //Laboratory Methods in Immunology. - 1990. - P. 39-51.

24. Cattaneo C., Gelsthorpe K., Phillips P., Sokol R.J. Detection of human proteins in buried blood using ELISA and monoclonal antibodies: towards the reliable species identification of blood stains on buried material. //Forensic Sci Int. 1992. Vol. 57, №2. P. 139-146.

25. Cattaneo C., Gelsthorpe K. Phillips P., Sokol R.J. Reliable identification of human albumin in ancient bone using ELISA and monoclonal antibodies H //Am J Phys Anthropol. -1992. Vol. 87, №3, P. 365-372.

26. Cribbs D.H., Ghochikyan A., Vasilevko V. et.al. Adjuvant-dependent modulation of Th1 and Th2 responses to immunization with beta-amyloid. //Int

Immunol. 2003, 15(4), 505-514.

27. Dapson RW. Macromolecular changes caused by formalin fixation and antigen retrieval. //Biotech Histochem. 2007; 82: 133-140.

28. Exley C., Siesjo P., Eriksson H. The immunobiology of aluminium adjuvants: how do they really work? //Immunol. 2010 31(3), 103-109.

29. Exley C., Swarbrick L., Gherardi R.K., Authier F.J. A role for the body burden of aluminium in vaccine-associated macrophagic myofasciitis and chronic fatigue syndrome. //Med Hypotheses. 2009, 72(2), 135-139.

30. Gherardi R.K. Lessons from macrophagic myofasciitis: towards definition of a vaccine adjuvant-related syndrome. //Rev Neurol (Paris). 2003, 159(2), 162-164.).

31. Govind Ragupathi, Jeffrey R Gardner, Philip O Livingston. Natural and synthetic saponin adjuvant QS-21 for vaccines against cancer //Expert Review of Vaccines. 2011. Vol. 10, № 4. P. 463 - 470.

32. Jennings R. et al. Adjuvants and Delivery Systems for Viral Vaccines-Mechanisms and Potential. //Dev. Biol. Stand. 1998. - Vol. 92. - P. 19-28.

33. Kwak L. W. et al. Modern vaccine adjuvants //Canc. Chemother. Biother. 1996. P. 749763

34. Malou Henriksen-Lacey, Karen Smith Korsholm, Peter Andersen Liposomal vaccine delivery systems //Expert Opinion on Drug Delivery. 2011. 8:4, 505-519.

35. Medunitsyn N. V. Basics of immunization and immunotherapy of infectious diseases. //M: GEOTAR-Media, 2005. — 512 p.

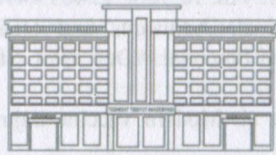
36. Shoenfeld Y., Agmon-Levin, N. "ASIA" - Autoimmune inflammatory syndrome induced by adjuvants. //J Autoimmun, 2011, 36(1), 4-8.

37. Tsutsumi H., Htay H.H., Sato K., Katsumata Y. Antigenic properties of human and animal bloodstains studied by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using various antisera against specific plasma proteins //IIZ Rechtsmed. 1987. Vol. 99, №3. P. 191-196.

38. Vogel F. R. Adjuvants in Perspective. Modulation of the Immune Response to Vaccine Antigens. //Dev. Biol. Stand. - 1998. Vol. 92. - P. 241-248.

39. Yamamoto Y., Tsutsumi A., IshizuH. Species identification of blood and bloodstains by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using anti-human immunoglobulin kappa light chain monoclonal antibody //Forensic Sci Int. — 1989. Vol. 40 J №1 P- 85-95.





MUHAMMARIYAT VA NASHIYOT BOLIMI

---

Объем – 1,19 п.л. Тираж – 30. Формат 60x84. 1/4. Заказ № 442-2019. Отпечатано РИО ТМА  
100109. Ул. Фароби 2, тел: (998 71)214-90-64, e-mail: rio-tma@mail.ru

