

УДК 615.37+543:615.2/3

## Abstract

L. Vergun,  
A. Tymchenko,  
<sup>1</sup>L. Korshun,

State Institution "Institute of  
Hematology and Transfusiology  
of NAMS of Ukraine",  
12 M. Berlinskogo str,  
Kyiv, Ukraine, 04060;  
<sup>1</sup>PJSC SIE "Diaproph-Med",  
35 Svitlitskogo str, Kyiv,  
Ukraine, 04123

### EXPERIENCE OF IMMUNOGLOBULIN LABORATORY ANALYSIS FOR INTRAVENOUS ADMINISTRATION

The aim of work was to study the content of total IgG, IgM, IgA in production batches of intravenous immunoglobulin (IVIG), obtained from the pool of donor blood plasma. Electrophoresis researches, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) of production IVIG 5 % and 10 % were used for it. The standards of comparison were 10 % IVIG of Mikrogen production and samples of IgG, obtained in a laboratory by the method of ion exchange chromatography. It is shown that immunoelectrophoresis and immunodotassay are informing methods which allowed estimating processes of IVIG cleaning. Quantity of IgM and IgA irrelevant proteins from five production batches was detected by enzyme linked immunosorbent assay. It's changed from 20 to 40 µg/ml and from 60 to 70 µg/ml accordingly. The level of irrelevant proteins is lower in 5 % IVIG than in 10 % IVIG. According to results, 5 % IVIG is let in on the ground for clinical practice as preparation with a lower content of irrelevant proteins. The presented methods of testing immunoelectrophoresis and enzyme linked immunosorbent assay are suitable for the estimation of processes of IgG isolation from human blood plasma from donors, does not require expensive equipment and large expense of reagents. The value of methods will considerably grow at the use of referent samples and monoclonal antibodies or monospecific serum to IgM and IgA.

**Keywords:** enzyme linked immunosorbent assay, immunoelectrophoresis, irrelevant proteins.

**Corresponding author:** [vergunt@mail.ru](mailto:vergunt@mail.ru)

## Резюме

Л. Ю. Вергун,  
А. С. Тимченко,  
<sup>1</sup>Л. М. Коршун,

ДУ « Інститут гематології та  
трансфузіології НАМН України»,  
вул. М. Берлінського, 12, Київ,  
Україна, 04060;  
<sup>1</sup> ПрАТ «НБК «Діапроф-Мед»,  
вул. Світлицького, 35,  
Київ, Україна, 04123

### ДОСВІД ЛАБОРАТОРНОГО АНАЛІЗУ ІМУНОГЛОБУЛІНІВ ДЛЯ ВНУТРІШНЬОВЕННОГО ВВЕДЕННЯ

Метою роботи було вивчення вмісту загальних IgG, IgM, IgA у виробничих серіях внутрішньовенних імуноглобулінів (IVIG), одержаних із пулу донорської плазми крові людини. Для її виконання використовували електрофоретичні дослідження, ензимозв'язаний імуносорбентний аналіз (ELISA) виробничих IVIG 5 і 10 %. Показано, що імуноелектрофорез та ELISA є інформативними методами, що дозволили оцінити процеси очищення IVIG. Цінність методів значно зростає при використанні референс-зразків та моноклональних або моноспецифічних сироваток до IgM і IgA людини.

**Ключові слова:** ензимозв'язаний імуносорбентний аналіз, імуноелектрофорез, нецільові протеїни.

**Резюме**

Л. Ю. Вергун,  
А. С. Тимченко,  
<sup>1)</sup> Л. Н. Коршун,

ГУ «Институт гематологии и трансфузиологии НАМН Украины», ул. М. Берлинского, 12, Киев, Украина, 04060;

<sup>1)</sup> ЧАО «НПК «Дианпроф-Мед», ул. Светлицкого, 35, Киев, Украина, 04123

**ОПЫТ ЛАБОРАТОРНОГО АНАЛИЗА ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ДЛЯ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ**

Целью работы было изучение содержания общих IgG, IgM, IgA в производственных сериях внутривенных иммуноглобулинов (IVIg), полученных из пула донорской плазмы крови человека. Для ее выполнения использовали электрофоретические исследования, энзимсвязанный иммуносорбентный анализ (ELISA) производственных IVIg 5 % и 10 %. Показано, что иммуноэлектрофорез и ELISA являются информативными методами, позволяющими оценить процессы очистки IVIg. Ценность методов значительно возрастает при использовании референс-образцов и моноклональных или моноспецифических сывороток к IgM и IgA человека.

**Ключевые слова:** энзимсвязанный иммуносорбентный анализ, иммуноэлектрофорез, нецелевые протеины.

**Автор, відповідальний за листування:** [vergunl@mail.ru](mailto:vergunl@mail.ru)

**Вступ**

Имуноглобулины человека относятся к наиболее используемым в клинической практике протеиновым препаратам плазмы крови. После выявления у них иммуномодулирующих и противовоспалительных свойств особенно активизировалось применение иммуноглобулинов при лечении многочисленных заболеваний, связанных с гуморальным иммунным дефицитом или дисфункцией иммунной системы [1].

Первые препараты иммуноглобулинов (Ig) применяли для внутримышечных введений с целью профилактики вирусных заболеваний, таких как корь, инфекционные гепатиты и полиомиелит, а позже для лечения больных с агаммаглобулинемией. Почти 20 лет Ig использовали как лечебные препараты для внутримышечных инъекций [2], поскольку агрегаты, присутствующие в них, активируя комплемент, вызывали анафилактические реакции. Были разработаны иммуноглобулины с модифицированным Fc-фрагментом, что позволило снизить количество осложнений [3]. Однако от молекулы Ig требуется не только интактный Fab-, но и полноценный Fc-фрагмент для осуществления опсонизации, активации комплемента и фиксации на определенных клетках.

Для достижения большего клинического эффекта последние десятилетия отдают предпочтение высокодозовой внутривенной терапии. В настоящее время показанием для применения Ig являются: первичные иммунодефициты, системные склерозы [4], диффузные склеродермии, приобретенные иммунодефициты, рецидивирующие бактериальные инфекции у детей [5], при

лимфопролиферативных заболеваниях, трансплантациях костного мозга, болезни Кавасаки, синдроме Вискота-Олдрича, иммунологической тромбоцитопенической пурпуре, хронической воспалительной демиелинизирующей полиневропатии, синдроме Guillain Barre [6–8]. Лечебный эффект внутривенных иммуноглобулинов (IVIg) установлен и при лечении нейроинфекций, энцефалитов [9; 10]. Специфическое связывание антигенов иммуноглобулинами может привести непосредственно к нейтрализации некоторых вирусов, бактерий и их токсинов [9; 11; 12].

Препараты IVIg, содержащие только антитела класса IgG, имеют название стандартных Ig. Для их производства требуются высокоэффективные технологии, позволяющие удалять нежелательные примеси: избыток IgA, IgM, возможные остатки тромбогенных субстанций. Конечный продукт не должен обладать прокоагулянтной активностью. Лечебный препарат не должен содержать IgA. Прежде всего, это относится к пациентам с дефицитом антител (АТ), отсутствием IgA и наличием АТ против IgA, т. к. все это может быть причиной анафилактических реакций. IgM обладает выраженными гемолитическими свойствами. Поэтому хорошую переносимость IVIg обеспечивает высокая степень очистки.

Таким образом, актуальность данной работы очевидна: оценка этапов получения IVIg и его конечного продукта протеиновой природы чувствительными, специфичными и экспрессными методами необходима при производстве препаратов высокой степени очистки для получения



лечебного препарата с удовлетворительной переносимостью.

Полиспецифический Ig человека для внутривенного введения, содержащий АТ класса IgM, имеет название IgM-обогащенный иммуноглобулин. Препарат содержит высокие титры антибактериальных, противовоспалительных и иммуномодулирующих АТ классов IgM, IgG и IgA. Это повышает выживаемость больных с тяжелыми бактериальными инфекциями [11; 13]. Известно, что полиспецифический Ig способен нейтрализовать эндотоксины у пациентов с сепсисом [12]. Не исключается существенная польза введения этого препарата и в борьбе с антибиотико-резистентными бактериями.

Главное требование для всех протеиновых препаратов плазмы донорской крови – высокий профиль инфекционной безопасности, который достигается многократным тестированием крови доноров. Тестирование сырья для производства препаратов плазмы крови полимеразной цепной реакцией (ПЦР) на РНК вируса гепатита С (HCV) является обязательным с 1 июля 1999 года для всех производителей препаратов плазмы крови в развитых странах. Согласно Европейской фармакопее, утвержденной 1 января 2001 года, каждая доза плазмы, входящая в пул, должна быть оттестирована не только на HbS-антиген (АГ) и АТ к HCV и ВИЧ, но пул плазмы обязательно должен быть оттестирован на РНК HCV.

Объектом нашего исследования были производственные серии IVIG человека. В задачи данной работы не входило изучение ксено-, алло-, аутоантител, оценка уровней специфических антител и вирусинактивации.

**Целью** работы было изучение содержания общих IgG, IgM, IgA в производственных сериях IVIG, полученных из пулов донорской плазмы крови, электрофоретическими методами и ELISA.

Для анализа были применены как ИЭФ, так и метод электрофореза в ПААГ по Laemmli, более чувствительные, экспрессные иммунодотанализ и ELISA, позволившие количественно оценить 5 и 10 % IVIG.

Новизна данной работы заключается в том, что предложен отечественный чувствительный, специфичный, полуколичественный метод ELISA для оценки этапов выделения IgG человека из плазмы крови человека, доступный для практической лаборатории.

## Материалы и методы

Исследовали 5, 10 % IVIG, полученные в производственных условиях. В качестве образцов сравнения были взяты: лабораторный образец IgG, выделенный из плазмы донорской крови человека методом ионообменной хроматографии (ИОХ) на DE-52 целлюлозе, пять серий IVIG производства ФГУП «НПО «Микроген» [14], а также альбумин сыворотки крови человека (ч. с. а.).

**Электрофоретические исследования.** Уровень чистоты выделенных IgG человека определяли методом иммуноэлектрофореза (ИЭФ) по Scheidegger [15] и электрофорезом по Laemmli [16]. Для ИЭФ использовали антивидовые гипериммунные сыворотки к IgG и к цельной сыворотке крови клинически здорового человека, полученные на кролях [17]. Постановку редуцирующего электрофореза в ДДС-Na-ПААГ осуществляли с использованием 10 % геля, триглицинового буфера pH 12 при силе тока 25 мА, в течение 2–3 часов. Протеины-маркеры молекулярной массы компании ThermoScientific (США) использовали как стандарты для определения молекулярной массы. Гелевые пластины окрашивали 0,1 % амидо-черным и Coomassie 250, отмывали от остатков красителя дистиллированной водой.

**ELISA.** Все исследуемые образцы IgG человека тестировали твердофазным иммуноферментным методом (ELISA) с использованием 96-луночных полистироловых пластин, предназначенных для ELISA (Sarstedt AG & Co. 82.1581, Costar, LabSystems CLINIPLATE), или мембран «Владипор», «Миллипор» (дот-анализ). При постановке ELISA использовали моноклональные антитела (моноАТ) к IgG человека (клон 156C10) и меченные энзимом пероксидазой хрена (ПХ) моноАТ (клон 156C10, клон 156Д11, клон 153Н11) производства ЧАО НПК «Диапроф-Мед».

Конъюгат поликлональных АТ к IgG человека с ферментом ПХ был синтезирован двухэтапным глутаральдегидным методом по Avrameas [18] в модификациях. Для этого в лабораторных условиях была получена антивидовая гипериммунная сыворотка к IgG человека.

Антивидовые гипериммунные сыворотки к IgG человека с активностью в РДП не ниже 1:64 были отобраны для синтеза антивидового конъюгата.

В дот-анализе использовали все вышеперечисленные конъюгаты и протеин А-золото (Япо-



ния). Для визуализации результатов реакции ELISA на планшетах использовали растворимый хромоген 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) (Merck, Germany) в 0,1 М цитратно-фосфатном буфере pH 4,5, на мембранах – нерастворимый хромоген – 3-амино-9-этилкарбазол (ACROS, Belgium) в 0,05 М Na-ацетатном буфере pH 5,0. Постановку ELISA выполняли прямым или «сэндвич»-вариантом.

Наборы реагентов «Иммуноскрин-G,М,А – ИФА – БЕСТ», «IgA общий – ИФА – БЕСТ», «IgA секреторный – ИФА – БЕСТ» (ЗАО «ВЕКТОР-БЕСТ», Новосибирск) использовали для количественного определения IgG, IgM, IgA. Постановку ELISA осуществляли согласно инструкции производителя. Результаты ELISA учитывали визуально или спектрофотометрически на ридере «Sanofi diagnostics Pasteur PR2100».

Концентрацию протеина в образцах определяли микрометодом Лоури, используя б. с. а. как референс.

Статистическую обработку результатов выполняли стандартными методами с использованием t критерия Фишера-Стьюдента и с помощью программного обеспечения Microsoft Excel 2003. Исследования проводили в трехкратном повторе. Данные считали достоверными при  $P \leq 0,05$  [19].

Эксперименты были проведены в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными V конгрессом по биоэтике (Киев, 25.09.13) и согласованными с положением Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 1986).

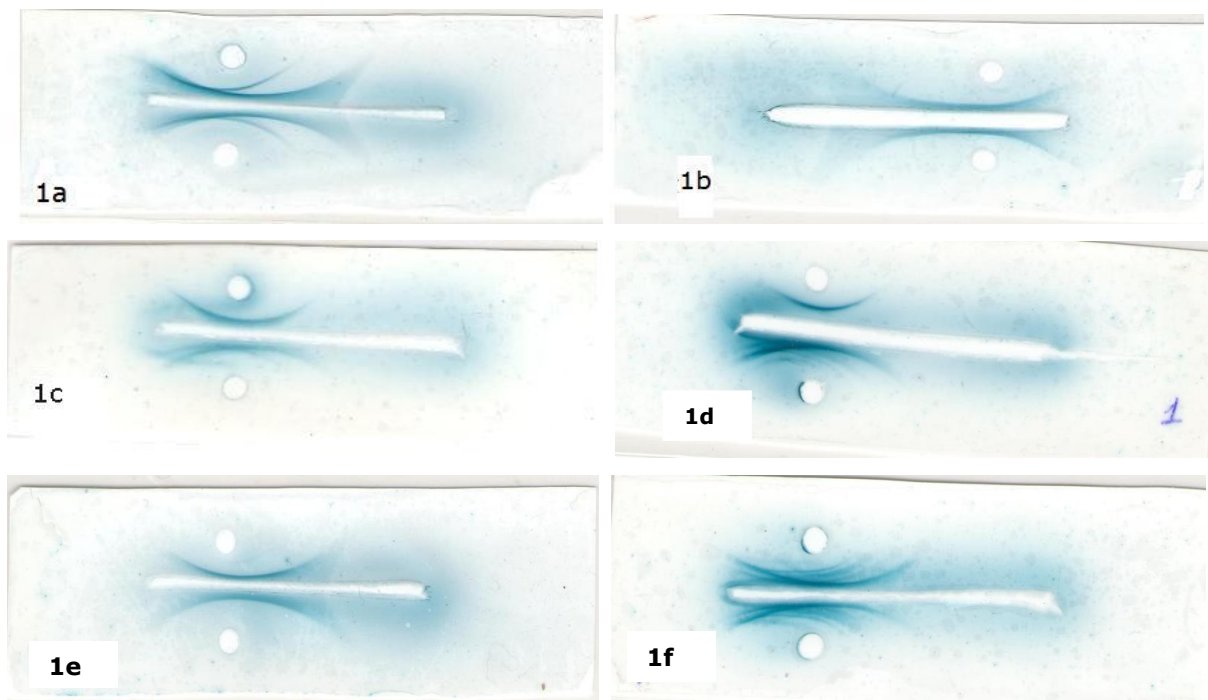


Рисунок 1 – Иммуноэлектрофореграммы препаратов производственного IVIG, образцов сравнения и сыворотки крови человека:

во всех канавках полиспецифическая антисыворотка к целевой сыворотке человека. В лунках – (a) производственный 10 % IVIG; (b) производственный 5 % IVIG; (c), (d) образцы сравнения: верхние лунки Ig G (ИОХ), нижние лунки Ig G (риваноловый метод) и цельная нормальная сыворотка человека; (e) образцы сравнения IVIG («Микроген»); (f) цельная нормальная сыворотка человека

#### Результаты исследования и их обсуждение

Как правило, при получении лечебных препаратов из плазмы донорской крови применяется метод осаждения протеинов органическими растворителями, а именно – осаждение протеиновых фракций этанолом [20; 21]. Применение

этого метода обеспечивает дополнительные условия чистого производства. Далее идут этапы доочистки полученных фракций, обязательная с 2004 года вирусинактивация, этапы фильтрации и концентрирования. Поступившие с производства в лабораторию образцы внутри-

венного 5 и 10 % IgG, выделенные из фракций II + III донорской плазмы, прошли обработку тритоном, полиэтиленгликолем, сольвент-детергентную инактивацию с последующей ИОХ на анионообменных и катионообменных носителях, ультрафильтрацией, концентрированием, фильтрацией [22]. Такие препараты хранили в нативном виде, не лиофилизировали

Для определения концентрации протеина в препаратах калибровочную линию строили по 8 точкам при каждой постановке реакции Лоури. Используя Microsoft Excel, получали аппроксимирующую (сглаженную) линию, уравнение, величину достоверности аппроксимации ( $R^2$ ). Аппроксимирующая линия служила линией определения концентрации протеина в тестируемых образцах.

Согласно результатам реакции Лоури концентрация протеина в исследуемых препаратах 10 % IVIG была от 150 до 170 мг/мл, 5 % – 90 мг/мл.

На рис. 1 представлены результаты качественного анализа – ИЭФ: 1a препараты производственного 10 % IVIG; 1b препараты произ-

водственного 5 % IVIG; 1с препарат сравнения IgG (ИОХ) и IgG, полученный риваноловым методом; 1d препарат сравнения IgG (ИОХ) и сыворотка клинически здорового человека; 1е препарат сравнения IVIG («Микроген»); 1f сыворотка клинически здорового человека. В пределах чувствительности этого метода в производственной серии 10 % IVIG выявлены нецелевые протеины, имеющие вид дополнительной дуги преципитации (1a). В 5 % IVIG подобные примеси отсутствуют, четко видна дуга преципитации, соответствующая IgG (1b).

Метод ИЭФ имел хорошую воспроизводимость и позволял дать оценку качества анализируемым протеиновым образцам.

Результаты электрофоретических исследований в ПААГ изображены на рис.2. На дорожках 1 и 2 электрофореграммы (1-я и 3-я серии 10 % IVIG) видны нецелевые протеины ~140 кДа и ~100 кДа, их количество меньше в 4-й и 5-й сериях 10 и 5 % IVIG соответственно (дорожки 3 и 4), более высокий уровень очистки демонстрируют лабораторные образцы IgG (дорожки 7 и 8).

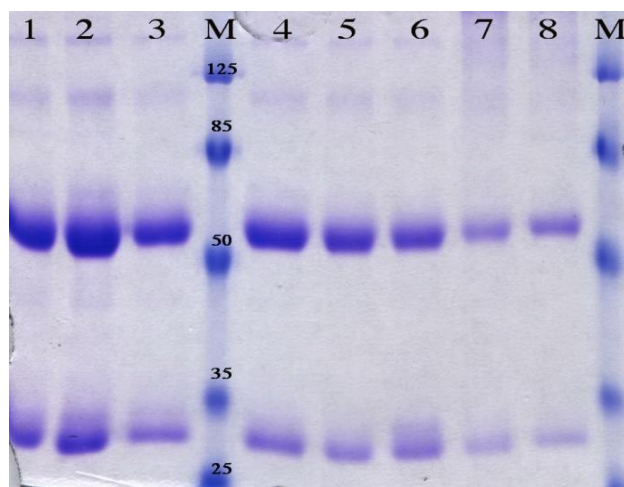


Рисунок 2 – Электрофореграмма препаратов производственного IVIG и образцов сравнения: М–протеины-маркеры молекулярной массы; дорожки 1, 2, 3 – 1-я, 3-я, 4-я серии 10 % IVIG; дорожка 4 – 5-я серия 5 % IVIG; дорожки 5, 6 – образцы сравнения IVIG «Микроген»; дорожки 7, 8 – образцы сравнения Ig G человека, полученные в лаборатории методом ИОХ

Высококчувствительный метод электрофореза в ПААГ по Laemmli позволил дополнительно проанализировать исследуемые образцы протеинов и подтвердить более низкий уровень нецелевых протеинов в 5 %, чем в 10 % IVIG.

В ELISA – дот-анализе с использованием различных конъюгатов, перечисленных в материалах и методах, тестирование разведенных

образцов (титрование) показало, что все конъюгаты пригодны для анализа производственных образцов данным методом. Преимущество следует отдать конъюгату протеин А-золото, т. к. он позволил достичь большей чувствительности метода минимум в 20 раз. 10 % IVIG выявляли в разведении  $(6,28 \pm 4,61)$ , лабораторные IgG (ИОХ) в разведении  $(3,5 \pm 1,58)$  ( $M \pm m$ ,



$P \leq 0,05$ ) по сравнению с конъюгатами на основе энзима и АТ к IgG ( $5,73 \pm 0,78$ ) и ( $2,63 \pm 0,57$ ) соответственно ( $M \pm m$ ,  $P \leq 0,05$ ) (рис. 3С).

\*Здесь и далее по тексту титры активности, выраженные как обратные величины разведений, представлены как отрицательные log с основанием 10.

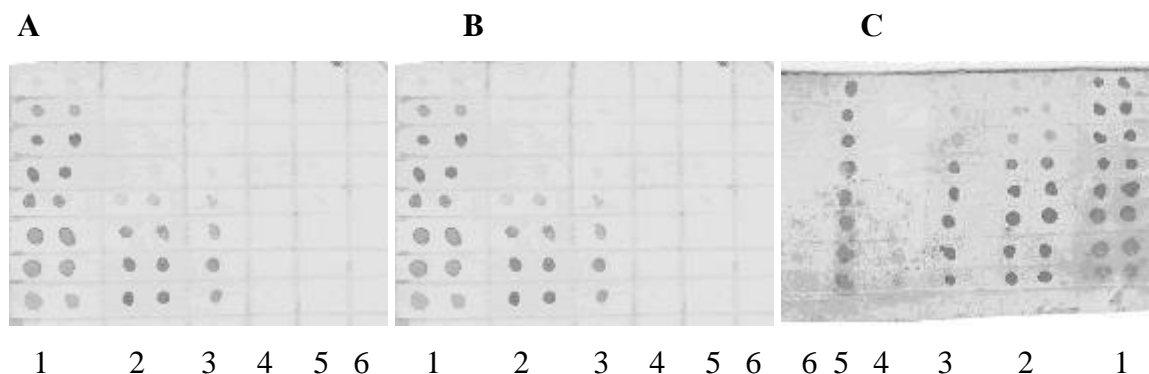


Рисунок 3 – Результаты дот-анализа с использованием конъюгатов:

А – полиIgG-ПХ; В – моноIgG-ПХ; С – протеин А – золото: 1 – производственный 10 % IVIG; 2, 3 – лабораторный IgG (ИОХ); 4–6 – три серии ч. с. а. Образцы раститрованы от 1: 4 снизу вверх, кратность 4 (в тексте обратные величины разведений представлены как отрицательные log с основанием 10)

Положительные результаты с образцами альбумина сыворотки человека (ч. с. а.) свидетельствуют о примесях IgG в этих препаратах, которые не выявляли конъюгаты на основе поли-, моноАТ. Конъюгаты на основе моно-, полиАТ равноценны по своим диагностическим

возможностям. IgG выявляли в титре ( $4,89 \pm 1,06$ ) ( $M \pm m$ ,  $P \leq 0,05$ ) в производственной серии 10 % IVIG, в титре ( $2,08 \pm 0,76$ ) ( $M \pm m$ ,  $P \leq 0,05$ ) в лабораторных IgG (ИОХ), в гетерологичных контрольных образцах (ч. с. а.) IgG не обнаружен (рис. 3А, рис. 3В).

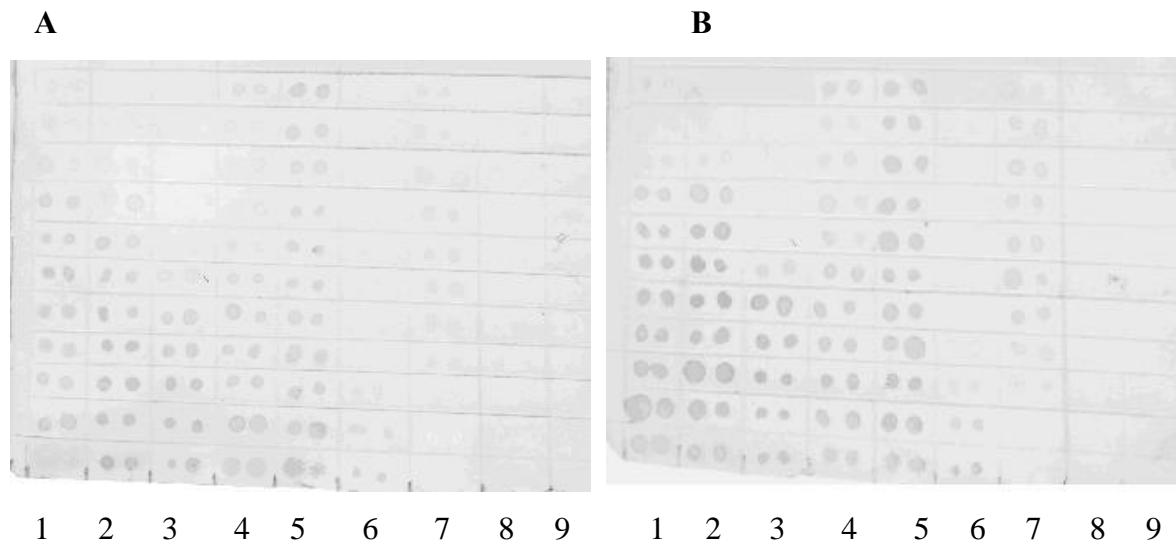


Рисунок 4 – Результаты дот-анализа с использованием конъюгатов:

А – полиIgG-ПХ; В – моноIgG-ПХ: 1, 2 – производственный 10 % IVIG; 3 – производственный 5 % IVIG; 4, 5 – образцы сравнения IVIG («Микроген»); 6 – лабораторный IgG (ИОХ); 7 – сыворотка человека; 8, 9 – две серии ч. с. а. Образцы раститрованы от 1: 5 снизу вверх, кратность 5 (в тексте обратные величины разведений представлены как отрицательные log с основанием 10)

При наличии высокоспецифических конъюгатов энзима и моно-, полиАТ к IgM, IgA, а также референс-образцов IgG, IgM, IgA они могут быть успешно применены для опреде-

ления уровня очистки препаратов IgG на этапах выделения его из плазмы крови. Результаты дот-анализа показали, что активность 5 % IVIG, полученного в производственных усло-

виях, ниже, чем 10 % IVIG ( $5,43 \pm 5,73$ ) по сравнению с ( $5,73 \pm 0,78$ ) ( $M \pm m$ ,  $P \leq 0,05$ ) (рис. 4А, рис. 4В), нецелевые примеси протеина в данном препарате не обнаружены методом ИЭФ (рис.1б). Замечен эффект «прозоны» в начальных разведениях с образцом сыворотки (рис. 4), в дот-анализе с использованием протеин А-золото это явление не встречалось.

Таким образом, полученные результаты оценки образцов иммуноглобулинов для внутривенного введения показали, что метод пригоден для количественного определения иммуноглобулинов в исследуемых образцах.

«Сэндвич»-вариант ELISA на 96-луночных планшетах также успешно может быть использован при тестировании производственных образцов, из испытанных планшетов преимущество следует отдать Sarstedt AG& Co. 82.1581 (данные не приведены).

Количественные методы определения IgM, IgA коммерческими тест-системами ELISA подтвердили присутствие IgM и IgA в производственных IVIG-препаратах и показали, что примеси IgM в четырех сериях 10 % IVIG составляли от 20 до 40 мкг/мл, примеси IgA – от 60 до 70 мкг/мл. В 5 % IVIG уровень IgA был 35 мкг/мл. В состав используемых коммерческих тест-систем входят калибровочные образцы (5 образцов) и контрольный образец, содержащие известные количества IgG, IgM, IgA. Разведения исследуемых образцов подбирали опытным путем, если при первой постановке теста концентрации в исследуемых образцах Ig были за пределами значений калибровочных образцов (калибровочного графика). Концентрацию в контрольном образце определяли по калибровочному графику. Данные были достоверны: показатели контрольных образцов, используемых тест-систем при постановке реакции соответствовали требованиям прилагаемой инструкции производителя.

Данные ВОЗ по допустимому количеству IgA в препаратах IVIG составляют менее 250 мкг/мл. Наши показатели укладываются в эти границы, однако следует помнить об индивидуальном подходе к пациентам, чтобы не спровоцировать анафилактический шок. Особенно это относится к лицам с дефицитом АТ и тем, кто ранее уже принимал подобную терапию. Украинская фармакопея не регламентирует уровень IgM в препаратах IVIG, но необходимо не забывать о том, что IgM обла-

дает выраженными гемолитическими свойствами [23].

Нежелательные явления, с которыми сталкиваются при применении IVIG, включают глубокие венозные и миокардиальные тромбозы, увеличение вязкости крови [24; 25]. Триада тромботического риска такова: изменения эндотелия в стенке сосудов, изменения вязкости крови и изменения в составе крови.

Существует статистика тромбоэмболических явлений (ТЭЯ). Так, из истории препарата Gammagard: в 2007 году на 6 тыс. продукции был зарегистрирован 1 случай ТЭЯ, в 2008 году на 10 тыс. – 2 ТЭЯ, в 2010 году на 12 тыс. – 4 ТЭЯ. Бельгийский препарат Kiovig: в 2007 году на 1 тыс. продукции был зарегистрирован 1 случай ТЭЯ, в 2008 году на 2 тыс. – 0 ТЭЯ, в 2010 году на 3 тыс. – 5 ТЭЯ. По Украине таких данных найдено не было. Частота ТЭЯ менее чем 1 на 10000 инфузий рассматривается как ожидаемый фактор риска тромбоза.

Экспериментально на нескольких сериях 5 и 10 % IVIG показано, что существует положительная корреляция между уровнем FXIa, определяемым специфическим методом, и результатами теста генерации тромбина и неактивированным частичным тромбопластиновым временем. Установлено, что фактор FXIa, присутствующий в некоторых препаратах IVIG, может способствовать риску тромбозов после терапии IVIG [26; 27]. Согласно литературным данным [28; 29], физико-химические свойства IgG и FXI (FXIa) сходны. Дефицит FXI в крови человека – явление редкое. Выявлено, что глубокий дефицит превалирует у людей еврейского происхождения [29]. Во фракции, полученной из пула плазмы крови человека после осаждения по методу Кона, присутствует более чем 98 % FXI, удаление его проводится на последующих этапах очистки. Концентрации, равные или ниже 2 mU/ml FXIa, не вызывают тромбообразования в Wessler-тесте [30; 31]. Пороговая концентрация FXIa, индуцирующая тромб в Wessler-тесте, лежит между 2 и 6 mU/ml. Все это свидетельствует о необходимости использования в ходе очистки IgG сорбентов, позволяющих избавляться от балластных белков, и методов, подтверждающих качество очистки. Компаниями «Октафарма», «Бакстер» и другими разработаны высокочувствительные *in vitro* – тесты (ELISA и иммуноблот-анализ)

для выявления FXIa. В 2011 году в Европейскую фармакопею внесена поправка, включающая контроль этапов эффективной редукции

#### Висновки

На основании представленных результатов лабораторных исследований очевидно, что:

- препарат 5 % IVIG имеет преимущества для применения в клинической практике по сравнению с 10 % IVIG как препарат с более низким содержанием нецелевых протеинов;
- представленные методы тестирования IVIG (ИЭФ и ELISA) пригодны для оценки

коагулянтов. В фармакопее нашей страны пока таких нововведений нет, предусмотрен только контроль активатора прекалликреина.

биотехнологических процессов выделения IgG из плазмы крови доноров, не требуют дорогостоящего оборудования и большого расхода реагентов;

- ценность указанных методов значительно возрастет при использовании референс-образцов, моноклональных АТ или моноспецифических сывороток к IgA, IgM человека на этапах контроля выделения IgG из плазмы крови доноров.

#### Подяка/джерела фінансування

Авторы благодарят сотрудников НПО «Микроген», ЧАО НПК «Диапроф-Мед»

за образцы IVIG и моноклональных антител.

#### References (список літератури)

1. Novaretti MCZ, Dinardo CL. Clinical applications of immunoglobulin: update. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2011;33(3):221-230. doi: 10.5581/1516-8484.20110058
2. Mohammadi A. Clinical use of intravenous immunoglobulin in immunodeficient patients. *Iranian Journal of Pediatrics.* 2000;10(1):1-10.
3. Friemel H, Brok J. *Osnovyi immunologii* [The principles of immunology]. Moskva: Mir Publ., 1986. 254 p.
4. Baleva M, Nikolov K. The role of intravenous immunoglobulin preparations in the treatment of systemic sclerosis. *Hindawi Publishing Corporation International Journal of Rheumatology.* 2011;2011:1-4. doi: 10.1155/2011/829751
5. Mellberg T, Gonzalez VD, Lindkvist A, Eden A, Shnerborg A, Sandberg JK, Svennerholm B, Gisslen M. Rebound of residual plasma viremia after initial decrease following addition of intravenous immunoglobulin to effective antiretroviral treatment of HIV. *AIDS Research and Therapy.* 2011;8 (2):1-6.
6. Kemmotsu Y, Nakayama T, Matsuura H, Saji T. Clinical characteristics of aseptic meningitis induced by intravenous immunoglobulin in patients with Kawasaki disease. *Pediatric Rheumatology.* 2011;9(28):1-5.
7. Dalakas MC, Illa I, Dambrosia JM, Dalakas MC, Soueidan SA, Stein DP, Otero C, Dinsmore ST, Mc Crosky S. A controlled trial of high-dose intravenous immunoglobulin infusions as treatment for dermatomyositis. *New England Journal of Medicine.* 1993;329(27): 1993–2000.
8. Palmer AL, Walker T, Smith JC. Acute respiratory distress syndrome in a child with Kawasaki disease. *South Med J.* 2005;98:1031–1033.
9. Shimoni Z, Bin H, Bulvik S, Niven M. The clinical response of West Nile virus neuroinvasive disease to intravenous immunoglobulin therapy. *Clinics and Practice.* 2012;2:41–42.
10. Imai T, Shimizu T, Hagiwara Yu, Hirayama T, Hasegawa Y. A case of Bickerstaff brainstem encephalitis successfully treated with intravenous immunoglobulin and methylprednisolone after unsuccessful immunoadsorption plasmapheresis. *Open Journal of Clinical Diagnostics.* 2013;3:1–4.
11. Berlot G, Dimastomatteo G. Use of IgM and IgA-enriched immunoglobulins in the treatment of severe sepsis and septic shock. *Minerva Anestesiologica.* 2004;70(10):739–745.
12. Berger D, Schleich S, Seidelmann M, Berger H.G. *Antiendotoxic therapy with polyclonal and polyvalent immunoglobulins: in vitro and in vivo studies.* Heidelberg: Springer-Verlag Publisher, 1993. pp.1164-1174.
13. Lekmanov AI. [Ig-M-enriched the intravenous immunoglobulin in the treatment of patients with hard sepsis and septic shock]. *Voprosy gematologii/onkologii v pediatrii.* 2011;10(4):44-45.
14. Zubkova NV. *Biotechnologicheskie aspekty virusnoy bezopasnosti preparatov immunoglobulinov: metodologiya, proizvodstvo, standartizatsiya* [Biotechnological aspects of virus safety of immunoglobulin prepara-





tions: methodology, production, standardization]. Perm': Permskaja Gos. Farm. Akademija Publ., 2012. 47p.

15. Friemel H. *Immunologicheskie metody* [Immunological methods]. Moskva: Mir Publ., 1979. 518 p.

16. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-685.

17. Vergun LYu, Klimchuk DA, Gorbik PP, Bondar' LA, Perehrestenko PM. [Synthesis of immunomagnetic sorbents for separation of hepatitis B and C viruses]. *Mikrobiologichny Zhurnal*. 2009;71(5):65-71.

18. Avrameas S, Ternynck T. Peroxidase labeled antibody and Fab conjugates with enhanced intracellular penetration. *Immunochemistry*. 1971;8:1175-1179.

19. Kuznecov VK. *Statisticheskaya obrabotka pervichnoy meditsinskoy informatsii* [Statistical processing of primary medical information]. Moskva: VINIMI Publ., 1978. 79 p.

20. Scoups RK. *Metody ochistki belkov* [Protein purification]. Moskva: Mir Publ., 1985. 356 p.

21. Cohn E, Strong L, Hughes W. Fractionation of proteins from plasma. *J. Am. Chem. Soc.* 1946;68:456–475.

22. Zagorodnja JA, Skrynnyk MM, Tymchenko AS, Kovalev RN, Karbovskyy VL, Kurkina OV, Makovskiy AA. [Development of production technology of immunoglobulin preparation of the new generation for intravenous administration]. *Biofarmaciticheskij zhurnal*. 2012;4(6):23-30.

23. Vershygora AE. *Osnovy immunologii* [The principles of immunology]. Kiev: Vyshha shkola Publ., 1980. 501 p.

24. Mintz R, Belyaev O, Tikva P, Nur Is, Timmoriam M, Bar L, Rehovot, Meidler, *inventors*. Immunoglobulin reduced in thrombogenic agents and preparation thereof. United States patent US 2012/0294847A1. 2012 Nov 22.

25. Dalakas MC. High-dose intravenous immunoglobulin and serum viscosity: risk of precipitating thromboembolic events. *Neurology*. 1994;44:223–226.

26. Wolberg AS, Kon RH, Monroe DM, Hoffman M. Coagulation Factor XI is a contaminant in intravenous immunoglobulin preparation. *Am. J. Hem.* 2000;65:30–34.

27. Reinhart WH, Berchtold PE. Effect of high-dose intravenous immunoglobulin therapy on blood rheology. *Lancet*. 1992;339:662–664.

28. Bouma BN, Griffin JH. Human blood coagulation factor XI. Purification, properties and mechanisms of activated factor XII. *JBC*. 1977;252:6432–6437.

29. Emsley J, Mc Ewan PA, Gailani D. Structure and function of factor XI. *Blood*. 2010; 115(13):2569–2577.

30. Wessler S, Reiner L, Sheps MC. Biological assay of a thrombosis – inducing activity in human serum. *J. Appl. Physiol.* 1959;14:943 – 946.

31. Fareed J, Walenga JM, Kumar A, Rock A. A modified stasis thrombosis model to study the antithrombotic actions of heparin and its fractions. *Semin. Thromb. Hemost.* 1985;1(2):155–175.

(received 12.11.2015, published online 28.03.2016)

(отримано 12.11.2015, опубліковано 28.03.2016)

