ИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

**Белково-пептидный комплекс ФС**

**из лейкоцитов крови свиней**

***Dapibus a precursor universa***

***leukocytes porcos* Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на субстанцию белково-пептидного комплекса из лейкоцитов крови свиней, с молекулярной массой менее 40000 и активностью ряда цитокинов. включая фактор, угнетающий миграцию макрофагов, получаемый в непрерывном производственном цикле.

Субстанция должна соответствовать ОФС «Биологические лекарственные препараты», ОФС «Фармацевтическая субстанция животного происхождения» и ниже приведенным требованиям.

**Описание.** Порошок от белого цвета с коричневым оттенком до желто-коричневого с сероватым оттенком.

**Растворимость.** Мало растворим в воде очищенной и натрия хлорида растворе 0,9 %, практически нерастворим в спирте 95 %.

**Подлинность.**

1. Стимулирует хемилюминесцентный ответ перитонеальных макрофагов или лейкоцитов. Определяют методом люминолзависимой хемилюминесценции (раздел «Специфическая активность»).

2. Угнетает миграцию микрофагов. Определяют в тесте торможения миграции макрофагов (раздел «Специфическая активность»).

3. Должны обнаруживаться две основные полосы полипептидов с молекулярной массой в пределах от 10 до 15. Определение проводят методом электрофореза в полиакриламидном геле с натрия додецилсульфатом в восстанавливающих условиях, с использованием 15% разделяющего геля, с последующей фиксацией 10% раствором трихлоруксусной кислоты и окрашиванием раствором Кумасси. ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле».

*Приготовление раствора субстанции с концентрацией 1 мг/мл по белку.* К содержимому одной упаковки (флакона) добавить воду очищенную, перемешать. Объем добавляемой очищенной воды в миллилитрах численно равен содержанию белка в упаковке, выраженному в миллиграммах (см. Белок). Концентрация конечного раствора будет 1 мг/мл. Например: если определение по Лоури показало, что во флаконе находится 5 мг белка, к содержимому флакона необходимо добавить 5 мл воды очищенной.

В качестве белков-маркеров используют набор маркерных белков, включающий белки с молекулярными массами 10, 15 и 40.

К 40 и 10 мкл раствора субстанции с концентрацией 1 мг/мл (по белку) добавляют соответственно 13,3 и 3,3 мкл буферного раствора для образцов, нагревают на кипящей водяной бане в течение 5 минут. Полученные образцы вносят в лунки. Нагрузка на лунки составляет 40 и 10 мкг по белку. В пустые лунки вносят по 15 мкл буферного раствора.

**Прозрачность**. Раствор субстанции в воде, с концентрацией 1 мг/мл, должен выдерживать сравнение с водой или с эталоном I. (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

**Цветность**. Раствор субстанции в воде, с концентрацией 1 мг/мл, должен быть бесцветным или выдерживать сравнение с эталоном Y5. (ОФС «Степень окраски жидкостей»).

**pH.** От 5,5 до 8,5. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии ОФС «Ионометрия», метод 3.

**Потеря в массе при высушивании.** Не более 7 %. Около 0,5 г экстракта (точная навеска) высушивают при температуре от 100 до 105 °С до постоянной массы (ОФС «Потеря в массе при высушивании»).

**Белок.** Не менее 2 мг белка в упаковке**.** (ОФС «Определение белка» метод Лоури).

**Микробиологическая чистота.** В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

**Специфическая активность.**

*Метод А. Тест люминол-зависимой хемилюминесценции. Индекс нредстимуляции (ИП) 2,0±0,5*.

Субстанция считается активной (содержит не менее 1000 ед. активности в мг, если ее разведение в 1000 раз (до концентрации 1,0 мкг/мл) стимулирует хемилюминисцентный ответ клеток, который оценивают по индексу примирования.

Определение биологической активности субстанции проводят е люминол- зависимой хемилюминисценции (ЛХЛ). Регистрацию (ЛХЛ) производят на хемилюминометре при термостатировании при температуре 37°С, при постоянном перемешивании. В качестве клеток - мишеней используют первичные мышиные перитонеальные макрофаги или лейкоциты периферической крови человека. Клетки получают в день эксперимента. 2-х мышей гибридов весом 20±2 г эвтанизируют цервикальной дислокацией, фиксируют на препаравальном столике брюшком кверху. Брюшную поверхность обрабатывают 70% спиртом, разрезают кожу по средней линии. Кожу фиксируют препаровальными иглами, обнажая мышечную поверхность брюшной стороны туловища. Вводят внутрибрюшинно, справа или слева от средней линии туловища до 10 мл (в зависимости от веса мыши) бесцветного раствора Хенкса содержащего гепарин (раствор для в/в или подкожного введения 5000 МЕ/мл, зарегистрированным в установленном порядке на территории РФ) в концентрации 10 МЕ/мл. Осторожно массируют вздувшееся брюшко в течение 2-3 мин. Шприцем с толстой иглой отсасывают экссудат. Иглу вводят сбоку от средней линии брюшины (в этом месте видно свободное от внутренностей пространство). Клетки перитонеальных макрофагов дважды отмывают раствором Хенкса, центрифугируя их 10-15 мин при 200-250 об/мин. Затем готовят суспензию клеток с концентрацией 10± 1,0 млн/мл в бесцветной среде 199. Подсчет макрофагов проводят в камере Горяева. Все растворы на всех этапах выделения макрофагов должны быть охлажденными (5±3°С).

*Получение лейкоцитов периферической крови человека* Клетки получают в день эксперимента. Лейкоциты человека получают из периферической крови здоровых доноров методом осаждения крови в 1 % растворе желатина. Периферическая венозная кровь в количестве 5 см забирается в вакуумную пробирку, содержащую гепарин. Гепаринизированная кровь смешивается с 1% раствором желатина в бесцветной среде-199 в равных объемах и инкубируется 30 минут при температуре 37°С. После осаждения эритроцитов надосадок забирается и трижды отмывается бесцветным раствором Хенкса при 250 об/мин по 10 мин. После последней отмывки клеточный осадок ресуспендируют в 1 мл бесцветной среды 199. Подсчет клеток проводят в камере Горяева. Раствор Хенкса на всех этапах выделения лейкоцитов должен быть охлажденным (5±3°С).

При оценке специфической активности субстанции 1±0,1 миллион клеток предварительно инкубируют при 37°С в центрифужных пластиковых пробирках в бесцветной среде 199, с добавлением гентамицина сульфата (из расчета 40 мкг/мл) в присутствии субстанции в дозах 0,1 мкг/мл, 1,0 мкг/мл, 10 мкг/мл, а в контроле клетки инкубируют в среде без субстанции.

После этого клетки дважды отмывают бесцветным раствором Хенкса, центрифугируя их 10 минут при 200 об/мин. Конечный клеточный осадок ресуспендируют в 0,5 мл бесцветного раствора Хенкса. Подсчет клеток проводят в камере Горяева.

Для регистрации спонтанной хемилюминесценции общий объем в кювете прибора должен быть 1 мл. Этот объем складывается из суспензии клеток, конечная концентрация которых должна быть 0,2±0,02 миллиона клеток/мл, люминола, объем которого составляет 5 мкл, опсонизированного зимозана, объем которого составляет 100 мкл оспонизированного зимозана (в случае проведения опыта с использованием перитонеальных макрофагов мышей) или 20 мкл оспонизированного зимозана (в случае проведения опыта с использованием лейкоцитов человека) и бесцветного раствора Хенкса, объем которого рассчитывается исходя из концентрации клеток в суспензии.

В кювету пробора наливают рассчитанное количество бесцветного раствора Хенкса

К рассчитанному объему бесцветного раствора Хенкса добавляют объем суспензии клеток в котором содержится 0,2±0,02 миллиона клеток, 5 мкл раствора люминола с концентрацией 20мМ/мл и проводят измерение спонтанной хемилюминисценции в течение 3-4 минут. После этого в кювету добавляют 100 мкл оспонизированного зимозана (в случае проведения опыта с использованием перитонеальных макрофагов мышей) или 20 мкл оспонизированного зимозана (в случае проведения опыта с использованием лейкоцитов человека) и регистрируют индуцированную хемилюминесценцию. Максимум индуцированной (ЛХЛ) вычисляют как разность между максимальной интенсивностью индуцированной и спонтанной хемилюминесценции.

*Метод Б.* *Капиллярный тест торможения миграции макрофагов (Индекс миграции (ИМ) 0,6±0,2.*

Определение биологической активности проводят по определению активности фактора, угнетающего миграцию макрофагов, с помощью устройства для формирования клеточных микрокультур

Субстанция считается активной (содержит не менее 1000 ед. активности в мг), если ее разведение в 1000 раз (до концентрации 1,0 мкг/мл) угнетает миграцию макрофагов, которую оценивают по индексу миграции.

Получение перитонеальных макрофагов мыши

Клетки получают в день эксперимента. Используют 2-х мышей гибридов , весом 20±2 г. Мышей эвтанизируют цервикальной дислокацией, фиксируют на препаравальном столике брюшком кверху. Брюшную поверхность обрабатывают 70% спиртом, разрезают кожу по средней линии. Кожу фиксируют препаровальными иглами, обнажая мышечную поверхность брюшной стороны туловища. Вводят внутрибрюшинно, справа или слева от средней линии туловища до 10 мл (в зависимости от веса мыши) бесцветного раствора Хенкса содержащего гепарин в концентрации 10МЕ/мл. Осторожно массируют вздувшееся брюшко в течение 2-3 мин. Шприцем с толстой иглой отсасывают экссудат. Иглу вводят сбоку от средней линии брюшины (в этом месте видно свободное от внутренностей пространство). Клетки перитонеальных макрофагов дважды отмывают раствором Хенкса, центрифугируя их 10-15 мин при 200-250 об/мин. Затем готовят суспензию клеток с концентрацией 10±1,0 млн/мл в среде RPMI-1640. Подсчет макрофагов проводят в камере Горяева. Все растворы на всех этапах выделения макрофагов должны быть охлажденными (5±3°С).

**Приготовление культуральной среды.**

Культуральная среда включает среду RPMI-1640 (НПП, 2мМ L-глутамина 5% эмбриональной телячьей сыворотки 40 мкг/мл генгамицина.

Для приготовления культуральной среды к одному флакону среды RPMI-1640 (450 мл) добавить 146 мг L-глутамина (все содержимое флакона, обмыв его средой RPMI-1640), 24 мл эмбриональной телячьей сыворотки и 0,5 мл гентамицина.

**Приготовление разведений субстанции.**

Для проведения эксперимента готовят исходный раствор субстанции с концентрацией 1 г/мл (соответствует 1000 мкг/мл), из которого затем производят серию разведений (1/100, 1/1000, 1/10000) в культуральной среде.

В лунки 96-луночного плоскодонного культурального планшета, в соответствии со схемой, помещают серии разведений субстанции в культуральной средев количестве100 мкл (каждую серию в 4-х параллелях). В контрольные лунки добавляют культуральную среду (в 4-х параллелях) по 100 мкл.

Собирают систему Мигроскрин, представляющую собой штатив для направленной и стандартной фиксации наконечников с клеточными культурами в строго вертикальном положении на высоте 1,0 - 1,5 мм над центром лунки 96-луночного культурального планшета, а также включающую 92 универсальных наконечника вместимостью 2-10 мкл для дозатора. Вставляют ножки штатива в угловые лунки планшета. Клеточную суспензию перитонеальных макрофагов набирают автоматической пипеткой в наконечники по 5 мкл в каждый, ополаскивают от избытка клеток однократным опусканием в среду и вставляют вертикально в гнезда штатива системы. Заполненный штатив с наконечниками выдерживают при комнатной температуре в течение 1 часа на строго горизонтальной поверхности. За это время происходит оседание клеток суспензии на дно лунок, где формируются стандартные клеточные микрокультуры.

Штатив с наконечниками осторожно снимают с планшета. Планшет с микрокультурой клеток помешают в строго горизонтальном положении эксикатор с 5% где культивируют в течение 18-20 часов при температуре 37°С. В ходе культивирования клетки мигрируют по дну лунки.

**Учет и обработка результатов.**

Количественный учет результатов после инкубации проводят на бинокулярной лупе визуально определяют размер колонии по шкале внутри окуляра. Микрокультуры имеют форму круга, поэтому определяют диаметр в одном направлении. Затем определяют среднее значение диаметра колоний по результатам измерения колоний в 4-х повторностях для каждого разведения и для контроля.

**Хранение.** В защищенном от света месте, при температуре 2-8 °С**.**

В соответствии с ОФС «Хранение»