

УДК 615.37:612.017.1:57.08

Ж.И. Авдеева, Н.А. Алтамова, С.Е. Акользина, Н.В. Медуницын

Государственный НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича (119002 г. Москва, пер. Сивцев Вражек, 41)

ИММУНОАДЬЮВАНТНЫЙ ЭФФЕКТ ЦИТОКИНОВ

Ключевые слова: цитокины, адьюванты, вакцины, иммунный ответ.

Изучение адьювантных свойств цитокинов на экспериментальных моделях свидетельствует о стимуляции иммуногенной активности вакцины против бешенства. Наиболее выраженный эффект наблюдался при использовании вместе с вакциной комплекса рекомбинантных цитокинов. При этом развитие иммунного ответа сопровождалось формированием высокого уровня вируснейтрализующих антител. Иммуноадьювантный эффект отмечен и при использовании рекомбинантных интерлейкина-1 β и фактора некроза опухоли- α в виде монопрепаратов, а также препарата «Полиоксидоний». Результаты исследований свидетельствуют о возможности использования цитокинов и других иммуномодулирующих препаратов в качестве адьювантов, способных повышать иммуногенную активность вакцин, а также о перспективности изучения новых подходов к управлению иммунным ответом.

Цитокины – низкомолекулярные гликопротеины, секретируемые преимущественно активированными клетками иммунной системы, обладают широким спектром биологического действия. Основные классы цитокинов включают интерлейкины (ИЛ), интерфероны α , β и γ , колониестимулирующие факторы, факторы некроза опухолей (ФНО) α и β , семейство ростовых факторов и хемокины [3, 8].

Цитокины определяют особенности формирования иммунного ответа, способствуя распознаванию антигенов, повышая экспрессию молекул главного комплекса гистосовместимости, молекул адгезии, вызывая активацию, пролиферацию и дифференцировку клеток иммунной системы и способствуя формированию клеток-эффекторов [3, 6, 9, 10]. Интенсивность и характер иммунного ответа при вакцинации зависят от многих факторов, прежде всего от свойств самой вакцины, пути и схемы ее введения, а также от функционального состояния организма и его генетических особенностей [4, 5].

Одним из перспективных направлений современной вакцинологии является обеспечение адекватного иммунного ответа при вакцинации. Использование препаратов с иммуномодулирующей активностью на фоне вакцинации может изменять баланс эндогенных цитокинов в организме и оказывать влияние на развитие антигенспецифического иммунного ответа [1, 2, 4, 5, 7]. В связи с этим цитокины, регулирующие каскад иммунных реакций на любое антигенное воздействие, можно рассматривать как потенциальные иммуноадьюванты.

Авдеева Жанна Ильдаровна – д-р. мед. наук, профессор, заведующая лабораторией иммунологии ГНИИ стандартизации и контроля; тел.: 8 (495) 241-25-34; e-mail: avd-cytok@newmail.ru.

Материал и методы. Экспериментальные исследования адьювантных свойств рекомбинантных цитокинов человека и препарата «Полиоксидоний» проведены на моделях иммунизации беспородных белых мышей вакциной против бешенства. Животные массой 12–14 г получены из питомника РАМН «Столбовая». Для иммунизации использованы культуральная концентрированная, очищенная методом ультрафильтрации, инактивированная сухая антирабическая вакцина (КОКАВ) и культуральная инактивированная сухая антирабическая вакцина (КАВ) производства ИПВЭ РАМН им. М.П. Чумакова.

Для внутримозгового заражения мышей применяли разрешающий фиксированный вирус бешенства, штамм CVS (Challenge virus standard) в объеме 0,03 мл. Заражающая доза вируса составляла 3–5 lg LD₅₀. В работе использованы рекомбинантные цитокины человека: ИЛ-1 β (НИИ ОЧБ, Санкт-Петербург), ИЛ-2 (ООО «Биотех», Санкт-Петербург), ФНО α (ВБ «Вектор», Бердск). Также использованы препараты, условно объединенные термином цитокины: тимозин- α 1 человека рекомбинантный, гибридный белок «Неотим», состоящий из ФНО α и тимозина- α 1 (НИИ прикладной микробиологии, Оболенск), а также препарат «Полиоксидоний» (Институт иммунологии, Москва).

В первой серии экспериментов вакцину КОКАВ вводили внутрибрюшинно в разведениях 1:50, 1:500 и 1:5000. Каждая группа, соответствующая одному из разведений, включала по 10–15 мышей. Вакцину и цитокины в виде монопрепаратов или комплексов вводили животным одновременно двукратно с интервалом в одну неделю. Дозы для ИЛ-1 β , ФНО α , тимозина- α 1 и неотима составляли 1 мкг на мышь. Дозы цитокинов, включенных в комплекс, составляли для ИЛ-1 β 10 нг, для ИЛ-2 – 10 МЕ, для ФНО α – 0,01 мкг на животное. В контрольных группах мышей вакцину применяли в тех же разведениях, но без цитокинов. На 8-й день после иммунизации мышам вводили фиксированный вирус бешенства. Наблюдение осуществляли в течение 30 дней, отмечая гибель животных с 6 дня после заражения.

Для оценки гуморального иммунного ответа у животных на 7-е сутки после иммунизации брали кровь. В сыворотке крови определяли титр вируснейтрализующих специфических антител в реакции биологической нейтрализации на беспородных белых мышах.

Во второй серии экспериментов оценивали иммуноадьювантное действие ФНО α и полиоксидония. Вакцину КАВ по вышеописанной схеме вводили

Таблица 1

Влияние комплекса рекомбинантных цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-2, ФНО α) на интенсивность иммунного ответа животных, иммунизированных антирабической вакциной

Группа	Разведения вакцины	Кол-во выживших животных, %	lg KP ₅₀	KP ₅₀
Контроль – КОКАВ (n=120)	1:50	40,0 ± 4,3	1,70 ± 0,1	1:50
	1:500	0		
	1:5000	16,7 ± 1,2		
КОКАВ + цитокины (n=120)	1:50	83,4 ± 3,8 ¹	2,56 ± 0,1 ¹	1:365
	1:500	46,1 ± 2,3 ¹		
	1:5000	7,7 ± 1,3		

¹ Разница с контролем статистически значима.

Таблица 2

Влияние монопрепаратов цитокинов на эффективность иммунизации животных вакциной КОКАВ (результаты 3 экспериментов)

Группа	Разведения вакцины	Кол-во выживших животных, %	lg KP ₅₀	KP ₅₀	Титр антител ¹
Контроль – КОКАВ (n=108)	1:25	27,3 ± 3,5	< 1,40	< 1:25	1:33,1
	1:125	25,0 ± 3,4			1:26,2
	1:625	0			1:10,0
КОКАВ + ИЛ-1 β (n=108)	1:25	45,5 ± 4,2 ²	1,66 ± 0,10	1:46	1:160,0
	1:125	40,0 ± 3,8 ²			1:67,8
	1:625	8,3 ± 1,6			1:10,0
КОКАВ + ФНО α (n=105)	1:25	46,2 ± 3,7 ²	1,45 ± 0,11	1:29	1:63,7
	1:125	20,0 ± 1,8			1:44,8
	1:125	0			1:10,0
КОКАВ + тимозин- α 1 (n=106)	1:25	23,1 ± 1,5	< 1,40	< 1:25	1:32,3
	1:125	0			1:12,6
	1:625	0			1:10,0
КОКАВ + неотим (n=108)	1:25	27,3 ± 2,0	< 1,40	< 1:25	1:28,2
	1:125	20,0 ± 1,9			1:20,0
	1:625	0			1:10,0

¹ В реакции биологической нейтрализации.

² Разница с контролем статистически значима.

в дозе 0,25 МЕ, ФНО α вводили внутривенно в дозах 0,1 и 1,0 мкг (100 и 1000 Ед на особь) за 24 часа одновременно или через 24 часа после иммунизации вакциной. Полиоксидоний использовали в дозах 40 или 500 мкг на мышь, а также в сочетании с ФНО α (0,1 мкг на мышь) через 24 часа после иммунизации. Контролем служили группы животных, которые получали одну вакцину, указанные дозы ФНО α , полиоксидония или полиоксидония в сочетании с ФНО α (двукратно с интервалом в одну

неделю), а также неиммунизированные мышья. Как и в первой серии экспериментов, после окончания иммунизации животным вводили фиксированный вирус бешенства.

Эффективность иммунизации, как при изолированном использовании антирабической вакцины, так и при сочетании ее с цитокинами, оценивали по проценту выживаемости животных, показателю предельно допустимого разведения вакцины, обеспечивающего 50% выживаемость в абсолютных значениях (KP₅₀) и в логарифмах (lg KP₅₀), а также по уровню титров вируснейтрализующих антител.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statgrafics. Достоверность уровня различия сравниваемых величин оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования и обсуждение полученных данных. Комплекс цитокинов, использованный при иммунизации животных антирабической вакциной КОКАВ, способствовал повышению ее эффективности. Отмечена большая выживаемость мышья при заражении их вирусом бешенства по сравнению с контрольной группой животных, иммунизированных одной вакциной. Выживаемость в опытной группе, получившей вместе с вакциной комплекс цитокинов, увеличилась в 7,3 раза по сравнению с контролем (табл. 1). Процент выживших животных, иммунизированных вакциной в разведении 1:50 и 1:500, в опытной группе статистически достоверно превышал показатели контрольной группы.

Использование в качестве адъювантов ИЛ-1 β или ФНО α при иммунизации животных антирабической вакциной способствовало повышению ее эффективности. Процент выживших мышья в группе с ИЛ-1 β при разведениях вакцины 1:25 и 1:125 был в 1,6 раза выше аналогичных показателей в контроле. В группе с ФНО α при разведении вакцины 1:25 указанный показатель был в 1,7 раза выше контрольного. У животных, получивших вместе с вакциной ФНО α или ИЛ-1 β , выживаемость увеличивалась в 1,2–1,8 раза по сравнению с контролем. В группах животных, получивших одновременно с вакциной тимозин- α 1 или неотим, этот показатель остался на уровне контроля (табл. 2).

При оценке титров вируснейтрализующих антител установлено, что наиболее выраженное стимулирующее действие на процесс антителообразования оказывали ИЛ-1 β и ФНО α . При введении вакцины в разведении 1:25 в сочетании с указанными цитокинами отмечено увеличение титров антител в 1,9–4,8 раза. При разведении вакцины 1:125 ФНО α и ИЛ-1 β повышали титры антител в 1,7–2,5 раза выше уровня контроля. При большем разведении вакцины стимулирующего влияния цитокинов на антителообразование не отмечено. В группах животных, которым вводились тимозин- α 1 и неотим, титры антител не повышались (табл. 2).

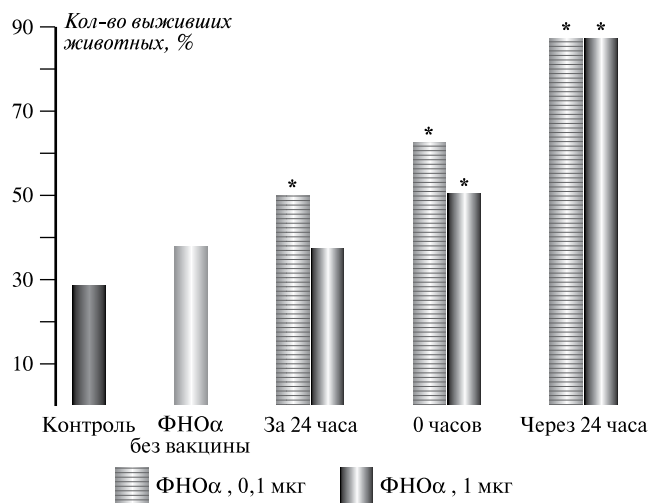


Рис. 1. Уровень защиты животных, иммунизированных вакциной КАВ в сочетании с ФНОα, при заражении вирусом бешенства («звездочкой» обозначена достоверность различий с контрольной группой).

Во второй серии экспериментов ФНОα способствовал повышению резистентности животных при заражении их вирусом в дозе $5 \lg LD_{50}$. Большая выживаемость отмечена при введении цитокина в дозе 0,1 мкг на мыш, при этом процент выживших животных, соответственно схемам введения, был в 1,8, 2,2 и 3,1 раза выше показателя контрольной группы. Введение ФНОα в обеих дозах через 24 часа после иммунизации приводило к наиболее выраженному повышению противовирусной устойчивости. Доля выживших мышей в опытных группах равнялась 87,5%, в контроле – 28%. Введение ФНОα в дозе 0,1 мкг неиммунизированным животным также повышало их резистентность к последующему заражению вирусом. Доля выживших мышей в указанной группе составила 37,5%. Повышение дозы цитокина до 1 мкг не сопровождалось появлением защитного эффекта (рис. 1).

На основании полученных результатов можно заключить, что использование рекомбинантного человеческого ФНОα при иммунизации мышей антирабической вакциной приводит к существенному повышению резистентности животных при заражении их вирусом бешенства. Адьювантный эффект зависит от дозы и схемы введения цитокина.

При изучении влияния препарата «Полиоксидоний» на противовирусную устойчивость животных установлено, что его введение через сутки после иммунизации способствовало повышению протективной активности антирабической вакцины и увеличивало выживаемость животных при заражении их вирусом бешенства. Защитный эффект зависел от дозы полиоксидония, при этом количество выживших мышей составило 44 и 56% соответственно (в контроле – 12,5%).

При сочетанном введении полиоксидония и рекомбинантного ФНОα (0,1 мкг на мыш) выживаемость экспериментальных животных составила 22 и 33% соответственно использованным дозам поли-

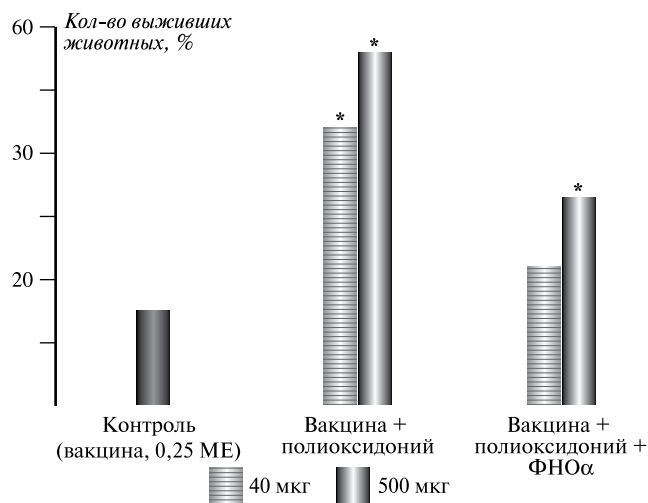


Рис. 2. Уровень защиты животных, иммунизированных вакциной КАВ в сочетании с полиоксидонием и ФНОα («звездочкой» обозначена достоверность различий с контрольной группой).

оксидония, что несколько ниже, чем при введении вакцины с полиоксидонием неиммунизированным антирабической вакциной мышам, что не защищало их от гибели (рис. 2).

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о стимуляции цитокинами иммунной активности вакцины против бешенства. Наиболее выраженная защита наблюдается при применении вместе с вакциной комплекса рекомбинантных цитокинов, который увеличивал выживаемость экспериментальных животных в 7,3 раза. При этом развитие иммунного ответа сопровождалось формированием более высокого уровня вируснейтрализующих антител. Иммуноадьювантный эффект отмечен также при использовании цитокинов в виде монопрепаратов. Рекомбинантный человеческий ФНОα наиболее эффективен при введении в дозе 0,1 мкг на мыш через сутки после иммунизации антирабической вакциной, повышая при этом противовирусную устойчивость у неиммунизированных мышей. Препарат «Полиоксидоний» в дозах 40 и 500 мкг также дозозависимо усиливал защитные свойства антирабической вакцины. Результаты экспериментов свидетельствуют о возможности использования цитокинов и других иммуномодулирующих препаратов в качестве адьювантов, способных повышать иммуногенную активность вакцин, а также о перспективности изучения новых подходов к управлению иммунным ответом.

Литература

1. Авдеева Ж.И., Акользина С.Е., Алпатова Н.А. и др. Действие цитокинов на протективные свойства антирабической вакцины // *Цитокины и воспаление*. 2007. Том 6, № 2. С. 46–50.
2. Акользина С.Е. *Цитокины в вакцинах и их адьювантное действие: автореф. дис. ... канд. мед. наук*. 1996. 30 с.
3. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. *Цитокины*. СПб.: Фолиант. 2008, 554 с.
4. Медуницын Н.В. *Вакцинология*. М.: Триада X, 2004. 446 с.