

УДК 615.37:612.017.1:57.08

Ж.И. Авдеева, Н.А. Алпатова, 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.

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 $\pm$ 4,3	1,70 $\pm$ 0,1	1:50
	1:500	0		
	1:5000	16,7 $\pm$ 1,2		
КОКАВ + цитокины (n=120)	1:50	83,4 $\pm$ 3,8 ¹	2,56 $\pm$ 0,1 ¹	1:365
	1:500	46,1 $\pm$ 2,3 ¹		
	1:5000	7,7 $\pm$ 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 $\pm$ 3,5	<1,40	<1:25	1:33,1
	1:125	25,0 $\pm$ 3,4			1:26,2
	1:625	0			1:10,0
КОКАВ + ИЛ-1 β (n=108)	1:25	45,5 $\pm$ 4,2 ²	1,66 $\pm$ 0,10	1:46	1:160,0
	1:125	40,0 $\pm$ 3,8 ²			1:67,8
	1:625	8,3 $\pm$ 1,6			1:10,0
КОКАВ + ФНО α (n=105)	1:25	46,2 $\pm$ 3,7 ²	1,45 $\pm$ 0,11	1:29	1:63,7
	1:125	20,0 $\pm$ 1,8			1:44,8
	1:125	0			1:10,0
КОКАВ + тимозин- α 1 (n=106)	1:25	23,1 $\pm$ 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 $\pm$ 2,0	<1,40	<1:25	1:28,2
	1:125	20,0 $\pm$ 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 , полиоксидоний или полиоксидоний в сочетании с ФНО α (двукратно с интервалом в одну

неделю), а также неиммунизированные мышы. 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 мышей 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 мышей 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).

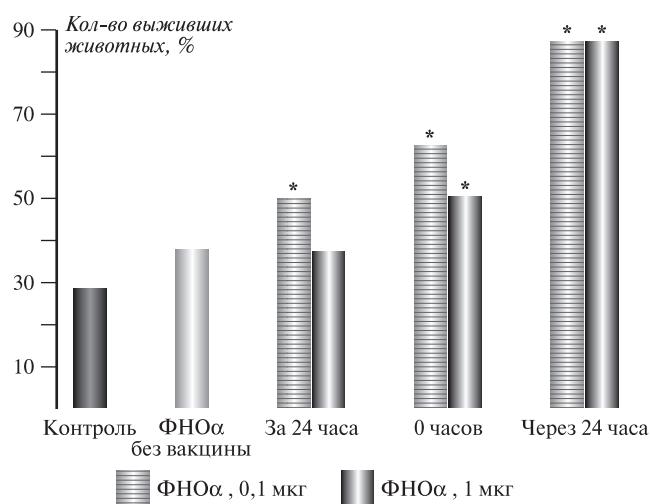


Рис. 1. Уровень защиты животных, иммунизированных вакциной КАВ в сочетании с ФНОα, при заражении вирусом бешенства («звездочкой» обозначена достоверность различий с контрольной группой).

Во второй серии экспериментов ФНОα способствовал повышению резистентности животных при заражении их вирусом в дозе 5 lg LD₅₀. Большая выживаемость отмечена при введении цитокина в дозе 0,1 мкг на мышь, 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 мышь) выживаемость экспериментальных животных составила 22 и 33% соответственно использованным дозам поли-

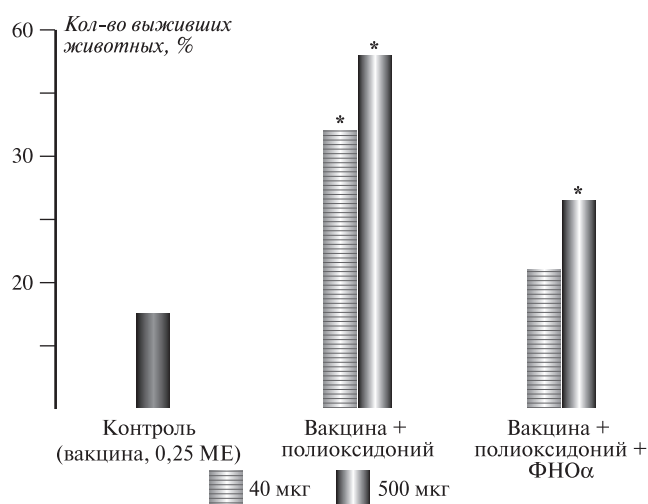


Рис. 2. Уровень защиты животных, иммунизированных вакциной КАВ в сочетании с полиоксидонием и ФНОα («звездочкой» обозначена достоверность различий с контрольной группой).

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 мышь 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.

5. Петров Р.В., Хаитов Р.М. Вакцины нового поколения на основе синтетических полиионов: история создания, феноменология и механизм действия, внедрения в практику // *Иммунология*. 1998. № 5. С. 4–11.
6. Симбирцев А.С. Цитокины — новая система регуляции защитных реакций организма. Цитокины и воспаление. 2002. Т. 1, № 1. С. 9–17.
7. Шестопалов А.М., Рассадкин Ю.Н., Устинова Е.Н. и др. Влияние фактора некроза опухолей альфа на эффективность вакцинации против бешенства // *Вопросы вирусологии*. 2002. № 3. С. 37–40.
8. Ярилин А.А. Основы иммунологии. М.: Медицина, 1999. 606 с.
9. Fradelizi D. Les cytokines: Facteurs solubles de la communication intercellulaire // *Med. trop.* 1998. Vol. 58, No. 4. P. 427–432.
10. Nash A.D., Lofthouse S.A., Barcham G.J. et al. Recombinant cytokines as immunological adjuvants // *Immunol. Cell Biol.* 1993. Vol. 71, No. 5. P. 367–379.

Поступила в редакцию 03.04.2009.

IMMUNOADJUVANT EFFECT OF CYTOKINES

Zh.I. Avdeeva, N.A. Alpatova, S.E. Akolzhina, N.V. Medunitsin
L.I. Tarasevich State Research Institute for Standardization and Control of Medical Biological Preparations (41 Sivtsev Vrazhek Lane Moscow 119002 Russia)

Summary — The paper gives consideration to the adjuvant properties of cytokines studied by using experimental models. They induced immunogenic activities by means of rabies vaccine. Combined with a complex of recombinant cytokines, the vaccine exhibited the most noticeable effects. Augmenting immune response was observed in parallel to high-level virus neutralizing antibody formation. The immunoadjuvant effects were observed when using recombinant interleukin-1b and tumor necrosis factor-α for monodrug therapy and “Polyoxidonium”. The research results were indicative of the possibility to apply cytokines and other immune-response modulating drugs as adjuvants capable of increasing immunogenic activities of the vaccines and highlight promising opportunities of researching into new approaches to immune response control.

Key words: cytokines, adjuvants, vaccines, immune response.

Pacific Medical Journal, 2009, No. 3, p. 19–22.

УДК 615.37:612.017.1

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

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

ЦИТОКИНЫ И ВАКЦИНЫ

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

Вакцины, изготовленные на основе клеток млекопитающих, содержат ряд провоспалительных цитокинов, набор и концентрация которых зависят от вида вакцины. Спонтанная и антигениндуцированная продукция цитокинов зависит от клеточной линии и характера антигена. Диплоидные клеточные штаммы (М-22 и L-68) секретируют цитокины спонтанно. Изучение синтеза цитокинов клеточными культурами может быть одним из критериев выбора субстрата для производства культуральных вакцин. Исследование адъювантных свойств цитокинов и препаратов, обладающих иммуномодулирующей активностью, на ряде экспериментальных моделей свидетельствуют о стимулирующем действии цитокинов на иммуногенную активность вакцин против гепатитов А и В. Наиболее выраженными иммуностимулирующими свойствами обладают рекомбинантные цитокины — фактор некроза опухоли-α и интерлейкин-1β, а также препараты «Полиоксидоний» и «Имунофан».

Цитокины оказывают влияние практически на все клетки, воздействуя на большинство процессов, протекающих в организме. Они обеспечивают межклеточную кооперацию и регулируют иммунные процессы. Их активная продукция происходит в ответ на различные стимулирующие агенты, их действие неспецифично. Цитокины образуют особую сеть, модулируя экспрессию поверхностных рецепторов и индуцируя секрецию друг друга. Благодаря высокоаффинным рецепторам на клетках-мишенях (константа диссоциации в пределах 10^{-10} – 10^{-12} М), они способны вызывать биологические эффекты в

малых концентрациях. Действие цитокинов плеiotропно, им присуща локальная (ауто- и паракринная) и системная (эндокринная) регуляторная активность [4, 8, 9, 12].

В настоящее время для оптимизации вакцинального процесса используются различные иммуномодуляторы, которые отличаются друг от друга по происхождению и механизму действия. Исследования по использованию цитокинов в качестве адъювантов немногочисленны, хотя иммуномодулирующий эффект таких адъювантов, как липополисахарид и мурамилдипептид, объясняют вовлечением в этот процесс цитокинов [1, 10, 11].

Цитокины обнаружены в вакцинах и других иммунобиологических препаратах, субстратом для изготовления которых являются клетки эукариотов. Значимость выявления цитокинов в вакцинных препаратах важна для оценки их влияния на иммуногенную активность вакцин. Эпителиальные, фибробластные и лимфоидные клеточные линии, используемые для производства иммунобиологических препаратов, способны секретировать цитокины спонтанно или при антигенной стимуляции [3, 11, 12]. Установлено содержание интерлейкинов (ИЛ) 1 и 6, а также гранулоцитарного и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующих факторов в антирабической и ряде других противовирусных вакцин. ИЛ-1β и фактор некроза опухоли-α (ФНОα) выявлены в лекарственных препаратах моноклональных антител, изготовленных на основе лимфоидных клеток человека. Большое количество цитокинов присутствует