



На правах рукописи

НИКИТИНА ТАТЬЯНА НИКОЛАЕВНА

**СТИМУЛЯЦИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА ПРЕПАРАТАМИ
ЦИТОКИНОВ
И ИХ СТАНДАРТИЗАЦИЯ**

14.03.09 – КЛИНИЧЕСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ, АЛЛЕРГОЛОГИЯ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

10 ИЮН 2010

МОСКВА - 2010

Работа выполнена в ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора

НАУЧНЫЕ РУКОВОДИТЕЛИ:

Академик РАМН, доктор медицинских наук,
профессор

Николай Васильевич Медуницын

Доктор медицинских наук, профессор

Жанна Ильдаровна Авдеева

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

Доктор медицинских наук, профессор

Людмила Ивановна Краснопрошина

Доктор медицинских наук, профессор

Леонид Васильевич Ковальчук

ВЕДУЩЕЕ УЧРЕЖДЕНИЕ:

ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, г. Москва

Защита состоится «17» Мая 2010 г. в 12⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 001.035.01. при НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН по адресу: г. Москва, Малый Казенный переулок, д. 5а.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН.

Автореферат разослан «14» Мая 2010 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

кандидат биологических наук



И. В. Яковлева

АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ

Одна из основных проблем современной иммунологии связана с вопросами регуляции иммунного ответа. Интенсивность иммунного ответа на введение чужеродного антигена (АГ) зависит от многих факторов, таких как функциональное состояние организма, его генетических особенностей, а также свойств самого АГ, дозы и схемы его введения (Петров Р.В., Хантов Р.М., 1999; Медуницын Н.В., 2010). Особую значимость вопросы регуляции иммунного ответа приобретают в связи с необходимостью обеспечения формирования надежного поствакцинального иммунитета.

В настоящее время отмечается рост как острых, так и хронических инфекционных заболеваний. Одним из основных и надежных способов профилактики распространения инфекционных болезней является вакцинация. Лица с длительно протекающими заболеваниями (хронические воспалительные и инфекционные заболевания, гепатиты, туберкулез, ВИЧ-инфекция, хроническая почечная патология, лица, находящиеся на гемодиализе и др.) составляют группу риска, которая является наиболее восприимчивой к инфекциям и должна быть вакцинирована в первую очередь.

Вопрос обеспечения адекватного иммунного ответа на вакцинацию у лиц с ослабленной иммунной активностью и с проявлениями иммунодефицита является актуальным. Решению этой проблемы способствует поиск и разработка средств, направленных на увеличение эффективности вакцинопрофилактики (Смирнов М.Н. с соавт., 1999; Медуницын Н.В., 2010).

Повышение эффективности вакцинации достигается путем использования адьювантов – веществ, которые усиливают иммунный ответ при одновременном их введении с АГ.

Согласно современным представлениям, механизм действия большинства используемых в настоящее время адьювантов опосредуется через активацию эндогенных цитокинов. В начале девяностых годов было высказано предположение об использовании цитокинов в качестве адьювантов вакцин. Это обусловлено тем, что в развитии иммунного ответа самое непосредственное участие принимают цитокины, которые являются низкомолекулярными гликопротеинами, секретируемыми различными клетками организма, выполняющими иммунорегуляторную функцию (Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., 2000; Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008).

Имеются сообщения об исследовании адьювантных свойств ряда цитокинов – ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-12, ИФγ, ФНОα, КСФ при иммунизации экспериментальных животных бактериальными и вирусными АГ (Лебедев В.В. с соавт., 1992; Авдеева Ж.И. с соавт., 2007; Pasquini S. et al., 1997; Sin J-I. et al., 1999; Hornef M.W. et al., 2000; Kim J.J. et al., 2000). Эффективность ИЛ-1 показана при вакцинации против гепатита В, инфекций, вызванных стрептококками и пневмококками, использовании гриппозной вакцины (Rao K.V.S., Nayak A.R., 1990; Blecha F. et al., 1995). ИЛ-2 в качестве адьюванта

использован для повышения иммуногенности вакцин БЦЖ и гриппозной (Maes R.F., 1999), в экспериментальных исследованиях - антирабической вакцины (Акользина С.Е., 1996; Provinciali M. et al., 1994), в ветеринарии - вакцин против ящура, бронхопневмоний, вирусных диарей крупного рогатого скота (Смирнов М.Н. с соавт., 1999).

В настоящее время, благодаря достижениям молекулярной биологии, разработаны лекарственные препараты на основе рекомбинантных белков цитокинов, которые могут быть использованы не только для проведения цитокинотерапии, но и в качестве иммуoadъювантов (Симбирцев А.С., с соавт., 2000; Масычева В.И., с соавт., 2001; Мац А.Н., с соавт., 2008; Медуницын Н.В., 2010).

Производство препаратов цитокинов на основе генно-инженерных технологий требует выполнения специальных требований как к контролю этапов процесса производства, так и к методам контроля качества готового продукта.

Для оценки качественных и количественных характеристик медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП), включая препараты рекомбинантных цитокинов, необходимо использование валидированных и аттестованных методов контроля показателей качества, включая оценку специфической активности, а также использование стандартных образцов (Петухов В.Г., 2003; Давлетбаева Л.Р., 2005; Борисов В.А., 2006).

Необходимость валидации методов контроля МИБП определена международными документами, рекомендациями Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), а также отечественными нормативными документами. При отсутствии Международных стандартных образцов важное место занимают отечественные отраслевые стандартные образцы, использование которых обеспечивает проведение качественного контроля препаратов МИБП (ГОСТ Р 52249-2004. Национальный стандарт Российской Федерации; Добровинский И.Е., 2005). Изучение вопросов стандартизации и валидации методов оценки качества МИБП по показателю специфической активности, включая лекарственные препараты цитокинов, является актуальным.

Таким образом, приведенные данные указывают на перспективность исследований по изучению иммуoadъювантных свойств лекарственных препаратов цитокинов и стандартизации методов их контроля.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение иммуностимулирующих свойств препаратов цитокинового ряда на экспериментальных моделях, включая модель с индуцированной иммуносупрессией, при иммунизации животных вакциной против гепатита В.

Валидация методов определения специфической активности препаратов рекомбинантных цитокинов человека - «Альнорин (рчФНО α)» и «Бефнорин (рчФНО β)» и аттестация отраслевых стандартных образцов.

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Изучить влияние препаратов цитокинового ряда - «Беталейкин (рчИЛ-1 β)», «Ронколейкин (рчИЛ-2)», «Аффинолейкин» и препарата «Имунофан» на интенсивность иммунного ответа животных при иммунизации вакциной против гепатита В.
2. Установить дозы и схемы введения вакцины и препаратов цитокинов при иммунизации экспериментальных животных.
3. Изучить адьювантные свойства цитокинов на модели животных без иммуносупрессии и животных с индуцированной циклофосфаном иммуносупрессией при однократной и двукратной иммунизации вакциной против гепатита В.
4. Изучить влияние цитокинов на интенсивность иммунного ответа по уровню частоты сероконверсии и концентрации в сыворотке крови специфических антител (АТ).
5. Провести валидацию методов определения специфической активности препаратов рчФНО α и рчФНО β с определением следующих характеристик – подлинность, воспроизводимость, повторяемость, линейность.
6. Разработать и аттестовать отраслевые стандартные образцы (ОСО) рчФНО α и рчФНО β для определения специфической активности препаратов «Альнорин (рчФНО α)» и «Бефнорин (рчФНО β)». Разработать нормативную документацию на стандартные образцы (ОСО рчФНО α и ОСО рчФНО β).

НАУЧНАЯ НОВИЗНА

Исследованные препараты цитокинового ряда - «Беталейкин (рчИЛ-1 β)», «Ронколейкин (рчИЛ-2)», «Аффинолейкин» и препарат «Имунофан», оказывают иммуноадьювантное действие при иммунизации экспериментальных животных вакциной против гепатита В.

Одновременное введение вакцины против гепатита В с препаратами цитокинов повышает интенсивность иммунного ответа животных, что сопровождается увеличением уровня сероконверсии и повышением концентрации специфических АТ по сравнению с животными, иммунизированными вакциной без цитокинов.

При иммунизации животных низкими дозами вакцины выраженный иммунный ответ развивается только в случае использования вакцины в сочетании с цитокинами. Иммунный ответ на вакцину, вводимую с цитокинами, приближается к ответу, который развивается на большую дозу вакцины без цитокинов.

Уровень иммунного ответа животных с иммуносупрессией при иммунизации вакциной с препаратами цитокинов соответствует уровню ответа животных без иммуносупрессии, иммунизированных аналогичными дозами АГ без цитокинов.

Проведена валидация методов определения специфической активности препаратов рчФНО α и рчФНО β . Разработаны и аттестованы ОСО определения специфической

активности, оформлены нормативные документы на ОСО рчФНО α (ОСО 42-28-400-08) и ОСО рчФНО β (ОСО 42-28-401-08).

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Экспериментальные исследования позволили расширить представления об особенностях иммунного ответа иммунодефицитных животных и животных без иммуносупрессии на сопоставимые дозы АГ вакцины против гепатита В, вводимой без цитокинов или с цитокинами, используемыми в качестве иммуноадьювантов.

Результаты исследований показали, что изученные препараты цитокинового ряда - «Беталейкин (рчИЛ-1 β)», «Ронколейкин (рчИЛ-2)», «Аффинолейкин», а также препарат «Имунофан», повышают уровень иммунного ответа на специфический АГ вакцины против гепатита В, что свидетельствует о перспективности использования указанных препаратов в качестве адьювантов при вакцинации.

Результаты исследований на животных с индуцированной иммуносупрессией свидетельствуют о возможности использования препаратов цитокинов для стимуляции иммунного ответа при вакцинации лиц, имеющих проявления иммунодефицита (хронических инфекционных и онкологических заболеваний, травмах, ожогах, ВИЧ-инфицированных, пациентов, находящихся на гемодиализе и др.).

Для усовершенствования и стандартизации методов контроля качества препаратов «Альнорин (рчФНО α)» и «Бефнорин (рчФНО β)» проведена валидация методов определения их специфической активности и подлинности. Разработаны два ОСО, утверждены Свидетельства и Инструкции по применению - ОСО рчФНО α (ОСО 42-28-400-08) и ОСО рчФНО β (ОСО 42-28-401-08), которые внесены в Реестр отраслевых стандартных образцов МИБП.

ВНЕДРЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ РАБОТЫ

Методы оценки специфической активности внесены в проекты ФСП на вновь разрабатываемые в ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» (г. Бердск) отечественные лекарственные препараты «Альнорин (рчФНО α)» и «Бефнорин (рчФНО β)».

Разработанные и аттестованные ОСО рчФНО α и ОСО рчФНО β используются при контроле качества указанных препаратов по показателю специфической активности.

ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

На экспериментальных моделях животных (без иммуносупрессии и с индуцированной циклофосфаном иммуносупрессией) показана эффективность использования исследованных препаратов цитокинового ряда - «Беталейкин (рчИЛ-1 β)», «Ронколейкин (рчИЛ-2)», «Аффинолейкин» и препарата «Имунофан», в качестве адьювантов при иммунизации вакциной против гепатита В.

При одновременном введении вакцины с препаратами цитокинов отмечена их способность усиливать иммунный ответ. У животных наблюдается более высокая частота сероконверсии и большая концентрация специфических АТ по сравнению с животными, иммунизированными вакциной без цитокинов.

Адьювантное действие цитокинов более демонстративно проявляется при использовании малых доз вакцины, на которые развивается слабый иммунный ответ в случае их использования без цитокинов, а также на экспериментальной модели животных с индуцированной иммуносупрессией.

Интенсивность иммунного ответа иммунодефицитных животных при иммунизации низкой дозой вакцины, вводимой с препаратами цитокинов, приближается к интенсивности ответа животных без иммуносупрессии, иммунизированных аналогичными дозами вакцины без цитокинов.

На примере валидации методов определения специфической активности препаратов цитокинов рчФНО α и рчФНО β предложен подход к валидации методов оценки специфической активности других препаратов цитокинов. Установленные в процессе валидации характеристики позволили аттестовать два СОС препаратов цитокинов - рчФНО α и рчФНО β .

АПРОБАЦИЯ МАТЕРИАЛОВ ДИССЕРТАЦИИ

Диссертация прошла апробацию 21. 04. 2009 г. на заседании Ученого совета ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора. Основные положения диссертационной работы представлены на Всероссийской научной конференции молодых ученых «Актуальные вопросы инфекционной патологии человека, клинической и прикладной иммунологии», Уфа, 2004; Всероссийской научно-практической конференции «Вакцинология 2006. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней», Москва, 2006; 6-й международной конференции «Клинические исследования лекарственных средств», Москва, 2007; Всероссийской научно-практической конференции «Вакцинология 2008. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней», Москва, 2008; XIII Всероссийском научном форуме «Дни иммунологии в С-Петербурге», С-Петербург, 2009; X Конгрессе «Современные проблемы аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии», Казань, 2009.

ПУБЛИКАЦИИ

По материалам диссертации опубликовано 11 печатных работ.

СТРУКТУРА И ОБЪЕМ ДИССЕРТАЦИИ

Диссертация изложена на 177 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, четырех глав

собственных исследований, обсуждения, выводов, указателя литературы и двух приложений. Работа иллюстрирована 23 таблицами и 13 рисунками. Библиографический указатель включает 103 отечественных и 157 иностранных источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Эксперименты по изучению адъювантных свойств препаратов цитокинов провели на 1303 мышах линии Balb/c (самки), весом 14 – 16 г.

Для иммунизации животных использовали вакцину против гепатита В «Engerix B» (фирма «GlaxoSmithKline», Бельгия). Вакцина содержит рекомбинантный HBsAg, полученный из дрожжевых клеток (*Saccharomyces cerevisiae*), адсорбированный на 3% растворе гидроокиси алюминия.

В качестве иммуоадъювантов использовали следующие препараты:

- «Беталейкин (интерлейкин 1-бета), лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного и подкожного введения» (ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА, г. С - Петербург);
- «Ронколейкин (интерлейкин-2 человека рекомбинантный), раствор для внутривенного и подкожного введения» (ООО «Биотех», г. С-Петербург);
- «Аффинолейкин» (Пермский Филиал ФГУП НПО «Микроген»);
- «Имунофан» (ООО НПП «Бионокс», г. Москва).

Препараты рекомбинантных цитокинов человека, для которых проведена валидация методов контроля специфической активности, разработаны и аттестованы ОСО:

- «Альнорин (рчФНО α), лиофилизат для приготовления раствора для инъекций»
- «Бефнорин (рчФНО β), лиофилизат для приготовления раствора для инъекций» (ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор», г. Бердск).

В работе также использованы:

- кроличьи поликлональные АТ к рчФНО α и АТ к рчФНО β , любезно предоставленные сотрудниками ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор»;
- линия клеток мышиных фибробластов L-929, любезно предоставленная сотрудниками института Иммунологии (п. Любучаны);
- актиномицин Д («Serva»);
- «Циклофосфан» (ОАО «Биохимик», г. Саранск).

При аттестации ОСО использовали Международные стандартные образцы:

- рчФНО α («NIBSC» Великобритания) 86/504, активность 40000 МЕ/мкг белка,
- рчФНО β («NIBSC» Великобритания) 87/640, активность 150000 МЕ/мкг белка.

Для определения в сыворотке крови экспериментальных животных специфических АТ к HBsAg использовали тест-систему «ВектоHBsAg-антитела-стрип» (ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск).

Схема иммунизации животных вакциной против гепатита В

Иммунизацию экспериментальных животных проводили вакциной против гепатита В «Engerix B». Использовали несколько доз вакцины, начиная с дозы 2,5 мкг/мышь до 0,003 мкг/мышь, которую вводили в объеме 0,5 мл внутривенно, однократно или двукратно с интервалом в две недели. Разведения вакцины готовили на 3% растворе гидроксида алюминия – $Al(OH)_3$, используя 3-х кратный шаг разведения.

Цитокины, применяемые в качестве иммуноадьювантов, использовали в виде монопрепаратов или в комплексе, включающем «Беталейкин (рчИЛ-1 β)» и «Ронколейкин (рчИЛ-2)». Цитокины вводили подкожно одновременно с вакциной однократно или двукратно.

При использовании монопрепаратов вводимая доза для каждого из цитокинов (расчет на 1 мышь) составляла: 10 нг для «Беталейкина (рчИЛ-1 β)», 100 МЕ - «Ронколейкина (рчИЛ-2)», 1,0 ед - «Аффинолейкина», 0,05 мкг - «Имунофана» в объеме 0,5 мл. Дозы препаратов, вводимых в комплексе, составляли 5 нг для «Беталейкина (рчИЛ-1 β)» и 50 МЕ - «Ронколейкина (рчИЛ-2)» (Лебедев В.В. с соавт., 1992; Акользина С.Е. 1996).

Для создания иммунодефицитного состояния животным до иммунизации ежедневно вводили циклофосфан в дозе 1 мг/мышь в объеме 0,5 мл внутривенно. Курс введения включал три инъекции препарата ежедневно. Перед реиммунизацией животным также 3-хкратно вводили циклофосфан. Состояние иммуносупрессии оценивали по снижению количества нейтрофилов и лейкоцитов в периферической крови животных.

Интенсивность иммунного ответа животных, иммунизированных вакциной против гепатита В, оценивали по частоте сероконверсии (в %), концентрации в сыворотке специфических АТ к HBsAg. Оценку иммунного ответа проводили в динамике. Взятие крови проводили через 15 дней после первой иммунизации из ретроорбитального синуса и 15 дней после повторного введения АГ – тотально. Свежие образцы сывороток хранили при температуре от 2 до 8 °С не более одной недели. При длительном хранении образцы сывороток сохраняли при температуре минус 20°С, подвергая оттаиванию однократно.

Определение уровня сероконверсии и концентрации АТ к HBsAg

Определение уровня сероконверсии и концентрации АТ к HBsAg в исследуемых образцах сыворотки экспериментальных животных проводили с использованием иммуноферментной тест-системы «ВектоHBsAg-антитела-стрип» (г. Новосибирск). При анализе результатов выделяли подгруппы животных, в сыворотке которых концентрация специфических АТ составляла менее 20, от 20 до 100 и выше 100 мМЕ/мл. В указанных подгруппах определяли средние значения концентрации специфических АТ и частоту выявления соответствующих уровней АТ (в %).

Определение специфической активности препаратов рчФНО α и рчФНО β

Специфическая активность препаратов рчФНО α и рчФНО β оценивается по их способности оказывать цитолитическое действие на клетки мышинных фибробластов L-929 в присутствии актиномицина Д. Предварительно подобранная «рабочая» концентрация актиномицина Д, присутствуя в среде для культивирования, должна вызывать не более 10% гибели клеток. РчФНО усиливает действие актиномицина Д, вызывая больший процент гибели клеток. Активность исследуемого образца оценивают по минимальной дозе, вызывающей гибель 50% клеток по сравнению с контролем, которым служат клетки, культивированные в среде, содержащей актиномицин Д в «рабочей» концентрации и не содержащей рчФНО. Уровень жизнеспособных клеток, сохранившихся после цитолитического действия рчФНО, оценивают путем определения оптической плотности (ОП) элюирующего раствора при длине волны 540 нм. Показатели ОП увеличиваются пропорционально количеству живых клеток, т.е. значения ОП обратно пропорциональны концентрации рчФНО в исследуемом образце. Определение специфической активности препаратов рчФНО проведено в сравнении с соответствующими Международными стандартными образцами (МСО) рчФНО α и рчФНО β («NIBSC», Великобритания).

Реакция нейтрализации цитолитического действия рчФНО

Реакцию нейтрализации проводят с целью определения подлинности препаратов рчФНО (рчФНО α или рчФНО β). Постановку реакции осуществляют с использованием специфических кроличьих сывороток, соответственно против рчФНО α или рчФНО β . Препарат рчФНО α должен быть специфичен и его действие должно нейтрализоваться специфической кроличьей сывороткой против рчФНО α и не нейтрализоваться сывороткой к рчФНО β . Соответственно, действие препарата рчФНО β должно нейтрализоваться сывороткой против рчФНО β и не нейтрализоваться сывороткой к рчФНО α . Препараты считаются подлинными, если «рабочее» разведение специфической сыворотки полностью нейтрализует определенную величину цитолитической активности (в МЕ) как исследуемых препаратов, так и стандартного образца.

Статистические методы обработки результатов. Статистическую обработку данных проводили на ПК с использованием стандартного пакета статистических программ «Statgraphics». Достоверность уровня различия сравниваемых величин оценивали с помощью t – критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение адъювантных свойств препаратов цитокинов при иммунизации экспериментальных животных вакциной против гепатита В

На экспериментальных моделях с индуцированной иммуносупрессией и без иммуносупрессии у животных было изучено влияние препаратов цитокинов на интенсивность иммунного ответа при иммунизации вакциной против гепатита В.

1. Экспериментальные исследования на животных без иммуносупрессии.

Первоначально проведены эксперименты по выбору адекватных доз вакцины, используемых для иммунизации, которые вызывали низкий уровень иммунного ответа и позволяли оценить иммуноадъювантный эффект препаратов цитокинов. Животных иммунизировали *однократно*, используя разные дозы вакцины - 2,5; 0,83; 0,27; 0,09; 0,03; 0,01; 0,003 мкг/мышь. Установлены оптимальные дозы АГ - 0,27 и 0,09 мкг/мышь, при введении которых наблюдался низкий уровень иммунного ответа, частота сероконверсии составляла от 20% до 33%.

Далее проведены эксперименты по подбору доз цитокинов, стимулирующих развитие специфического иммунного ответа.

Изучена зависимость уровня иммунного ответа экспериментальных животных от схемы введения цитокинов. Вакцину вводили в ранее подобранных дозах однократно. Цитокины вводили с вакциной одновременно, за 2 дня или через 2 дня после введения вакцины. В условиях проведенных экспериментов сроки введения цитокинов, относительно введения вакцины, существенно не влияли на уровень иммунного ответа. В последующих экспериментах препараты цитокинов вводили одновременно с вакциной, поскольку одновременное введение максимально приближено к условиям практического применения адъювантов.

На следующем этапе исследования оценивали уровень сероконверсии животных при *однократной* иммунизации различными дозами вакцины (от 0,83 до 0,01 мкг/мышь) в сочетании с препаратами цитокинов «Беталейкин (рчИЛ-1 β)» и «Ронколейкин (рчИЛ-2)». Контролем служили животные, иммунизированные одной вакциной (Табл. 1).

Проведенные эксперименты показали, что уровень сероконверсии животных, иммунизированных вакциной в сочетании с цитокинами, выше, чем показатель в контрольной группе при сопоставлении ответа на аналогичные дозы ($p < 0,05$).

Ответ на меньшие дозы вакцины, вводимой на фоне цитокинов, приближался к ответу на большую дозу вакцины. Уровень сероконверсии на 15 день эксперимента отмечен в 40 – 60% случаев после иммунизации вакциной в дозах 0,09 мкг и 0,27 мкг/мышь на фоне введения цитокинов. Аналогичный уровень сероконверсии (40%) отмечался у животных контрольной группы, иммунизированных одной вакциной в дозе

0,83 мкг/мышь. Более выраженный ответ наблюдали в группах животных, которым вакцину вводили в сочетании с препаратом «Беталейкин (рЧИЛ-1β)».

Таблица 1.

Оценка влияния препаратов цитокинов - «Беталейкин (рЧИЛ-1β)», «Ронколейкин (рЧИЛ-2)» на выраженность иммунного ответа при иммунизации вакциной против гепатита В (однократная иммунизация)

Доза АГ при иммунизации (мкг/мышь)	Количество сероположительных животных (в %)					
	АГ (контроль)		АГ+рЧИЛ-1β		АГ+рЧИЛ-2	
	15 день	30 день	15 день	30 день	15 день	30 день
0,83 (n=190)	40,0± 6,9	20,0± 5,7	50,0± 6,0**	33,3± 5,6	25,0± 5,2	20,0± 4,8
0,27 (n=185)	28,5± 3,3	17,1± 2,7	57,9± 4,9*	22,2± 4,1	47,8± 5,0*	21,0± 4,0
0,09 (n=160)	20,0± 5,2	0	60,0± 6,9**	25,0± 6,1*	40,0± 6,9*	30,0± 6,5*
0,03 (n=40)	0	0	16,0± 8,4*	10,0± 6,8*	20,0± 9,1*	0
0,01 (n=40)	0	0	10,0± 6,8**	0	0	16,0± 8,4**

Примечание: * - различие достоверно (p<0,05) по отношению к контрольной группе

** - различие достоверно (p<0,05) между показателями опытных групп

- в таблице представлены результаты 4-х экспериментов

Следует отметить, что при иммунизации животных минимальными дозами вакцины (0,03 и 0,01 мкг/мышь) ответ наблюдали только в случае использования АГ в сочетании с цитокинами (рЧИЛ-1β или рЧИЛ-2), тогда как при введении одного АГ иммунный ответ не развивался.

В следующей серии экспериментов оценивали иммунный ответ животных после *двукратной* иммунизации (с интервалом 15 дней), используя ранее подобранные дозы вакцины (0,27 или 0,09 мкг/мышь). Цитокины - «Беталейкин (рЧИЛ-1β)» и «Ронколейкин (рЧИЛ-2)» вводили животным как на этапе *иммунизации*, так и *реиммунизации*. Схема экспериментов представлена на рисунке 1.

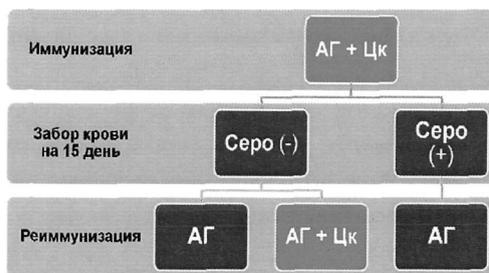


Рисунок 1. Схема экспериментов с использованием цитокинов на этапе иммунизации и реиммунизации.

Перед реиммунизацией на 15 день эксперимента были выделены группы серонегативных и серопозитивных животных. Животные серонегативной группы были

разделены на две подгруппы. Опытную подгруппу реиммунизировали вакциной в сочетании с препаратами цитокинов, контрольную – одной вакциной.

Результаты исследований на 30 день эксперимента представлены на рисунке 2.

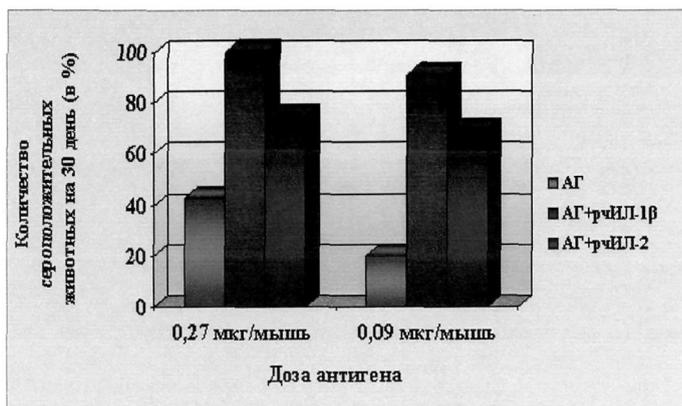


Рисунок 2. Оценка влияния цитокинов («Беталейкин - рЧИЛ-1β» и «Ронколейкин - рЧИЛ-2») на выраженность иммунного ответа после реиммунизации *серонегативных* животных вакциной против гепатита В (30 день эксперимента).

Как видно из рисунка 2, при реиммунизации выделенной серонегативной подгруппы животных вакциной в сочетании с цитокинами, количество серопозитивных животных на 30 день эксперимента было больше по сравнению с животными контрольных групп, реиммунизированных одной вакциной. В группах с рЧИЛ-1β при дозах вакцины 0,27 или 0,09 мкг/мышь уровень сероконверсии был в 2,3 и 4,5 раза выше (100%; 90,9%) по сравнению с контролем. Уровень сероконверсии в контроле составлял для дозы 0,27 мкг/мышь – 42,8%, 0,09 мкг/мышь - 20%. В группах с рЧИЛ-2 количество серопозитивных животных было в 1,7 и 3,4 раза больше (75,0 %; 69,2%) по сравнению с контролем. Отмечено, что уровень иммунного ответа животных, реиммунизированных вакциной в сочетании с рЧИЛ-1β, был выше по сравнению с группой животных, реиммунизированных АГ в сочетании с рЧИЛ-2 ($p < 0,05$).

Группа серопозитивных животных, выделенная на 15 день эксперимента после первичной иммунизации, была реиммунизирована одной вакциной. К 30 дню все животные остались серопозитивными.

В следующей серии экспериментов оценивали иммуноадьювантное действие комплекса препаратов цитокинов, включающего «Беталейкин (рЧИЛ-1β)» и «Ронколейкин (рЧИЛ-2)», а также препаратов «Аффинолейкин», «Имунофан», которые использованы как на этапе *иммунизации*, так и *реиммунизации*. Животных иммунизировали вакциной в дозе 0,27 мкг/мышь (рис. 3).

Результаты проведенных исследований показали, что все исследуемые препараты цитокинов проявляли иммуноадьювантное действие.

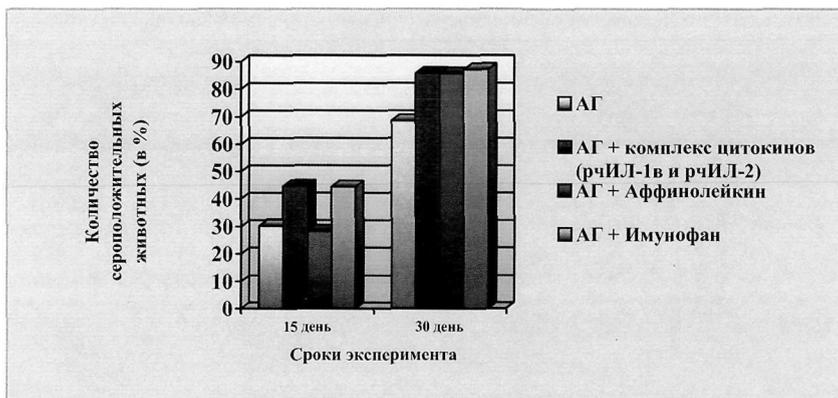


Рисунок 3. Оценка влияния препаратов цитокинов на выраженность иммунного ответа животных, иммунизированных вакциной против гепатита В в динамике (15 и 30 дни эксперимента).

Введение комплекса, включающего «Беталейкин (рЧИЛ-1 β)» и «Ронколейкин (рЧИЛ-2)», было так же эффективно, как и ранее изученное индивидуальное введение указанных препаратов. Следует отметить, что стимулирующий эффект цитокинов наблюдался как на 15, так и на 30 дни эксперимента. Исключением является препарат «Аффинолейкин», его стимулирующее действие отмечено только на 30 день эксперимента, то есть после повторного введения с вакциной.

При реиммунизации животных в сочетании с комплексом препаратов цитокинов на 30 день эксперимента количество сероположительных животных было в 1,2 раза больше (85,8%) по сравнению с группой животных, иммунизированных одной вакциной (68,6%). При введении вакцины с препаратом «Аффинолейкин» количество сероположительных животных было в 1,2 раза больше (85,7%), с препаратом «Имунофан» в 1,3 раза больше (87,2%) по сравнению с контрольной группой.

Таким образом, в результате исследований, проведенных на животных без индуцированной иммуносупрессии, установлено, что все используемые препараты цитокинов в виде монопрепаратов или комплекса цитокинов оказывали в различной степени иммуноадьювантное действие при иммунизации животных вакциной против гепатита В. Введение цитокинов одновременно с АГ приводило к увеличению числа серопозитивных животных по сравнению с контрольной группой, иммунизированной одним АГ. Наибольшим стимулирующим эффектом обладал препарат «Беталейкин (рЧИЛ-1 β)» по сравнению с другими препаратами цитокинов.

Стимулирующий эффект цитокинов отмечен как после первичной иммунизации животных вакциной против гепатита В, так и после реиммунизации животных, которые

оставались серонегативными через 2 недели после первичной иммунизации, по сравнению с животными, иммунизированными одной вакциной. Меньшие дозы вакцины, используемые в сочетании с цитокинами, вызывали иммунный ответ, сопоставимый с ответом на большие дозы вакцины, вводимые без иммуноаdjувантов.

2. Экспериментальные исследования на животных с индуцированной иммуносупрессией.

Состояние иммуносупрессии вызывали двукратным курсом введения циклофосфана (перед иммунизацией и реиммунизацией). Использовали две дозы вакцины – 0,83 мкг и 0,27 мкг/мышь. Оценивали интенсивность иммунного ответа иммунодефицитных животных (опытные группы) по сравнению с уровнем ответа животных без иммуносупрессии (контроль) на 15 день после иммунизации.

В результате проведенных исследований установлено, что иммунный ответ иммунодефицитных животных на одинаковые дозы вакцины был менее выраженным. Количество сероположительных животных в опытной группе было в 1,8 и 1,6 раза меньше ($26,1 \pm 5,7\%$ и $25,3 \pm 5,6\%$), соответственно двум дозам АГ (0,83 мкг и 0,27 мкг), по сравнению с контрольной группой животных. Количество сероположительных животных в контрольной группе составляло $48,5 \pm 6,5\%$ и $40,1 \pm 6,3\%$ при использовании двух вышеуказанных доз вакцины. Различия между сравниваемыми показателями опытной и контрольной групп статистически достоверны ($p < 0,05$).

Животные опытной и контрольной групп на 15 день исследования были разделены на серонегативных и серопозитивных. Серонегативных животных реиммунизировали одним АГ или АГ в сочетании с препаратом «Беталейкин (рЧИЛ-1β)». Схема построения эксперимента представлена на рисунке 4.

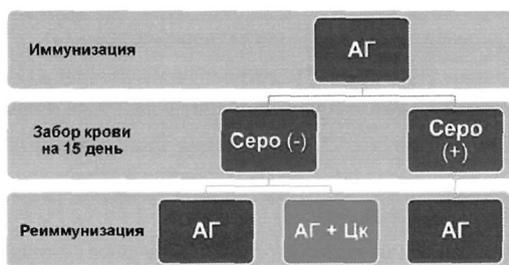


Рисунок 4. Схема экспериментов с использованием цитокинов на этапе реиммунизации.

Результаты исследования приведены в таблице 2.

Как видно из таблицы 2, к 30 дню эксперимента после реиммунизации группы серонегативных животных АГ в сочетании с рЧИЛ-1β уровень иммунного ответа был значительно выше по сравнению с группой животных, реиммунизированных одним АГ. Так, в опытной группе иммунодефицитных животных, реиммунизированных АГ в

сочетании с рЧИЛ-1β, количество серопозитивных животных было в 1,7 и 1,2 раза больше (87,5% и 62,5%) по сравнению с животными, реиммунизированными одним АГ (55,5% и 50,0%), соответственно двум дозам АГ (0,83 и 0,27 мкг/мышь).

В контрольной группе животных без иммуносупрессии, после реиммунизации серонегативных животных АГ с препаратом «Беталейкин (рЧИЛ-1β)», уровень сероконверсии был в 1,4 раза выше (100%) по сравнению с животными, реиммунизированными одним АГ (68,6 и 70,0%, соответственно двум дозам АГ). Иммунный ответ иммунодефицитных животных (опытные группы) на одинаковые дозы вакцины был ниже по сравнению с животными без иммуносупрессии (контроль). Однако, следует отметить, что уровень иммунного ответа при использовании цитокинов у иммунодефицитных животных (62,5% - 87,5%) приближается к уровню ответа животных без иммуносупрессии, иммунизированных одним АГ (68,6% - 70%).

Таблица 2.

Оценка выраженности иммунного ответа серонегативной группы животных после реиммунизации вакциной против гепатита В (30 день эксперимента)

Группа	Доза АГ (мкг/мышь)	Реиммунизация	
		АГ	АГ + рЧИЛ-1β
Контрольная (АГ) (n=70)	0,83	68,6 ± 7,9	100
	0,27	70,0 ± 7,8	100
Опытная (ЦФ + АГ) (n=120)	0,83	55,5 ± 6,4	87,5 ± 4,3* **
	0,27	50,0 ± 6,5*	62,5 ± 6,3*

Примечание: * - различие достоверно ($p < 0,05$) по отношению к контрольной группе

** - различие достоверно ($p < 0,05$) между показателями опытных групп

- в таблице представлены результаты 3-х экспериментов

Серопозитивная группа животных была реиммунизирована одним АГ. У всех животных сохранялась сероконверсия до 30 дня эксперимента.

На следующем этапе исследования оценивали интенсивность иммунного ответа иммунодефицитных животных, которым вводили цитокины - «Беталейкин (рЧИЛ-1β)» и «Ронколейкин (рЧИЛ-2)» как на этапе иммунизации, так и реиммунизации (опытные группы). Контролем служили иммунодефицитные животные, иммунизированные одним АГ в дозах 0,83 или 0,27 мкг/мышь.

Результаты исследований показали, что на 15 день после первичной иммунизации количество сероположительных животных, иммунизированных АГ в сочетании с препаратом «Беталейкин (рЧИЛ-1β)», в 1,6 и 1,3 раза больше ($42,3 \pm 6,4\%$ и $35,1 \pm 6,2\%$), соответственно двум дозам АГ, по сравнению с контрольной группой, иммунизированной одним АГ. После иммунизации АГ с препаратом «Ронколейкин (рЧИЛ-2)» - в 1,5 и 1,2 раза больше ($39,2 \pm 6,3\%$ и $30,6 \pm 5,9\%$) по сравнению с контролем. Уровень сероконверсии в контрольной группе составил $26,1 \pm 5,7\%$ и $25,3 \pm 5,6\%$, соответственно двум дозам АГ. Статистически значимое различие показателей отмечено в группе животных (доза

0,83 мкг/мышь), иммунизированных АГ в сочетании с рЧИЛ-1 β , по сравнению с контрольной группой.

Так же, как в предыдущей серии экспериментов, на 15 день животные были разделены на серонегативных, которым повторно вводили АГ или АГ в сочетании с цитокинами, и серопозитивных, которых реиммунизировали одним АГ.

Результаты исследований представлены на рисунке 5.

Как видно из рисунка 5, к 30 дню эксперимента при реиммунизации серонегативных животных АГ в сочетании с препаратами цитокинов уровень иммунного ответа был существенно выше по сравнению с животными, реиммунизированными одним АГ. Так, в группах животных, реиммунизированных АГ с препаратом «Беталейкин (рЧИЛ-1 β)», отмечена 100% сероконверсия соответственно двум дозам АГ 0,83 мкг и 0,27 мкг/мышь. При реиммунизации АГ в сочетании с рЧИЛ-2 сероконверсия наблюдалась в 85,7% и 100% случаев при двух указанных дозах. Тогда как при реиммунизации одним АГ – 87,5% - 82,1% и 66,6% - 80%, соответственно указанным группам животных.

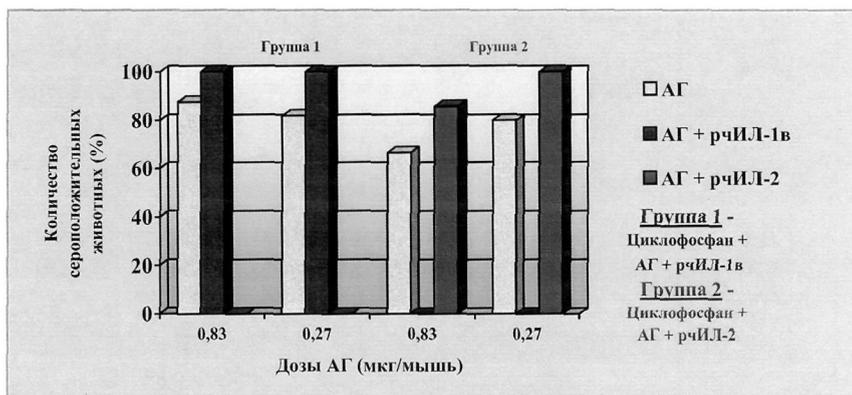


Рисунок 5. Оценка влияния цитокинов (рЧИЛ-1 β и рЧИЛ-2) на выраженность иммунного ответа серонегативной группы иммунодефицитных животных после реиммунизации (30 день эксперимента).

Группы сероположительных животных после реиммунизации АГ на 30 день эксперимента сохранили сероконверсию в 100% случаев.

3. *Экспериментальные исследования по оценке эффективности иммунизации вакциной против гепатита В на животных с индуцированной иммуносупрессией по уровню специфических АТ.*

В данной серии экспериментов оценивали уровень иммунного ответа по концентрации специфических АТ у животных с индуцированной иммуносупрессией (опытные группы) и животных без иммуносупрессии (контроль). На 15 день эксперимента были выделены серопозитивные животные опытной и контрольной групп, которых реиммунизировали одним АГ. При оценке результатов выделяли подгруппы животных с

концентрацией АТ менее 20, от 20 до 100 и выше 100 мМЕ/мл. Определяли также средние значения концентрации АТ (мМЕ/мл) и частоту их выявления в каждой из подгрупп (в %). Результаты оценки уровня специфических АТ в динамике (на 15 и 30 дни эксперимента) приведены в таблицы 3.

Таблица 3.

Оценка концентрации АТ серопозитивной группы животных с иммунодефицитом и без иммунодефицита на 15 и 30 дни эксперимента (иммунизация вакциной против гепатита В)

Группы животных	Концентрация АТ (мМЕ/мл)	Средние значения концентрации АТ (мМЕ/мл) (Диапазон выявляемых показателей уровня АТ) Количество животных с указанным уровнем АТ(%)			
		15 день		30 день	
		0,83	0,27	0,83	0,27
АГ контрольная (n=90)	< 20	15,1±0,8 (12,3-19,6) 64,8±8,1	14,1±0,5 (12,9-15,9) 54,5±8,5	-	14,6±2,1 (12-19) 27,2±7,6
	20-100	47,1±11,6 (25-74) 35,2±8,1	43,2±11,1 (27-72) 45,5±8,5	34,5±17,4 (23-86) 25,0±7,3	45,6±12,2 (23-64) 27,2±7,6
	>100	-	-	420,6±65,2 (170-798) 75,0±7,3	452,0±131 (182-790) 45,6±8,5
ЦФ + АГ опытная (n=90)	< 20	13,3±1,3 (12-20) 84,5±4,7*	13,5±0,9 (12-19) 80±5,2*	-	19,1±0,4 (18-20) 60,0±10,3*
	20-100	41,4±5,8 (23-62) 15,5±4,7*	44,5±14,6 (30-59) 20,0±5,2*	25,2±1,5 (21-34) 83,3±4,8*	42,7±4,3 (31-51) 40,0±6,3*
	>100	-	-	160,5 ±19,6* (141-180) 16,7±4,8*	-

Примечание: * - различие достоверно ($p < 0,05$) по отношению к контрольной группе
- в таблице представлены результаты 3-х экспериментов

Как видно из таблицы 3, уровень иммунного ответа иммунодефицитных животных был ниже по сравнению с животными без иммунодефицита. Указанная закономерность отмечена как после однократного, так и после двукратного введения АГ. Так, на 15 день эксперимента в опытной группе иммунодефицитных животных максимальная концентрация АТ была в пределах от 20 до 100 мМЕ/мл и частота их выявления в 2,3 раза ниже (15,5% и 20,0%) по сравнению с контрольной группой животных без иммуносупрессии - 35,2% и 45,5%, соответственно двум дозам АГ.

К 30 дню эксперимента (доза 0,83 мкг/мышь) в опытной и контрольной группах животных стали выявляться АТ в концентрации выше 100 мМЕ/мл. При этом в опытной

группе количество животных с указанным уровнем АТ было в 4,5 раза меньше (16,7%) по сравнению с контрольной – 75,0%. При дозе 0,27 мкг/мышь в опытной группе концентрации АТ находились в пределах от 20 до 100 мМЕ/мл, тогда как в контрольной - выявлялись АТ в концентрации выше 100 мМЕ/мл.

Средние значения концентрации АТ на 30 день эксперимента в опытной группе животных (доза 0,83 мкг/мышь) были в 2,6 раза ниже (160,5 мМЕ/мл) по сравнению с контрольной группой, где средние значения концентрации АТ составляли 420,6 мМЕ/мл. При дозе 0,27 мкг отмечена аналогичная закономерность.

Таким образом, интенсивность иммунного ответа иммунодефицитных животных на вакцину против гепатита В ниже по сравнению с животными без иммуносупрессии, об этом свидетельствует как более низкая частота выявления, так и более низкие уровни концентрации специфических АТ, определяемых на 15 и 30 дни эксперимента.

Анализ выделенной серонегативной группы животных будет приведен ниже в таблице 5.

Следующая серия экспериментов проведена на животных с индуцированной циклофосфаном иммуносупрессией, изначально иммунизированных АГ на фоне введения цитокинов - «Беталейкин (рчИЛ-1β)» и «Ронколейкин (рчИЛ-2)» (опытные группы). Контролем служили иммунодефицитные животные, иммунизированные одним АГ.

На 15 день эксперимента были выделены группы серопозитивных животных, которых реиммунизировали одним АГ (Табл. 4).

Как видно из таблицы 4, на 15 день эксперимента при двух дозах АГ в опытной группе животных, иммунизированных АГ с препаратом «Беталейкин (рчИЛ-1β)», максимальная концентрация АТ находилась в пределах от 20 до 100 мМЕ/мл. Животных с указанным уровнем АТ в опытной группе (доза АГ 0,83 мкг/мышь) было в 2,3 раза больше (35,0%) по сравнению с контрольной, иммунизированной одним АГ (15,5%). При дозе АГ 0,27 мкг наблюдалась аналогичная закономерность (соответственно 45% и 20%).

В группе животных, иммунизированных АГ с препаратом «Ронколейкин (рчИЛ-2)» при двух дозах АГ, максимальная концентрация АТ находилась также в пределах от 20 до 100 мМЕ/мл. Количество животных с указанной концентрацией АТ было в 2,4 и 1,5 раза больше (37,5%; 31,5%) по сравнению с контрольной группой животных, иммунизированных без цитокинов (15,5% и 20,0%), соответственно двум дозам АГ.

В группе животных с рчИЛ-1β (доза 0,83 мкг/мышь) на 30 день эксперимента стали выявляться АТ в концентрации выше 100 мМЕ/мл. Частота их выявления была в 2,7 раза больше (44,4%) по сравнению с контрольной группой, иммунизированной одним АГ, где количество животных с указанной концентрацией АТ составляло 16,7%. При дозе АГ 0,27 мкг/мышь в опытной группе с рчИЛ-1β у 20% животных концентрация АТ была выше 100 мМЕ/мл, тогда как в контрольной максимальной концентрация АТ находилась в пределах от 20 до 100 мМЕ/мл.

Таблица 4.

Оценка концентрации АТ серопозитивной группы иммунодефицитных животных на 15 и 30 дни эксперимента
(иммунизация вакциной против гепатита В на фоне введения цитокинов)

Группы животных	Концентрация АТ (мМЕ/мл)	Средние значения концентрации АТ (мМЕ/мл) (Диапазон выявляемых показателей уровня АТ) Количество животных с указанным уровнем АТ(%)			
		15 день		30 день	
		0,83	0,27	0,83	0,27
ЦФ+ АГ контроль ная (n = 90)	< 20	13,3±1,3 (12-20) 84,5±4,7	13,5±0,9 (12-19) 80±5,2	-	19,1±0,4 (18-20) 60,0±10,3
	20-100	41,4±5,8 (23-62) 15,5±4,7	44,5 ±14,6 (30-59) 20,0±5,2	25,2±1,5 (21-34) 83,3±4,8	42,7±4,3 (31-51) 40,0±6,3
	>100	-	-	160,5±19,6 (141-180) 16,7±4,8	-
ЦФ + АГ + рЧИЛ-1β опытная (n = 89)	< 20	18,4±0,4* (17-20) 65,0±6,2*	19,1±0,4* (17-20) 55,0±5,7*	17,6±1,2 (17-20) 16,8±4,8	17,8±0,7 (16,2-19,8) 40,0±6,3*
	20-100	39,2±7,6 (21-80) 35,0±6,2*	46,3±3,2 (30-59) 45,0±5,7*	42,4±6,3* (24-69) 38,8±6,3*	30,7±3,2* (30-37) 40,0±6,3
	>100	-	-	368,0±52,5* (153-525) 44,4±6,4*	158,5±6,5* (152-165) 20,0±5,2*
ЦФ + АГ + рЧИЛ-2 опытная (n = 90)	< 20	17,1±0,5* (15-19) 62,5±6,3*	17,9±0,3* (17-19,6) 68,5±6,0*	-	18,6±0,9 (18-20) 23,2±5,4*
	20-100	32,8±5,0* (20-48) 37,5±6,3*	26,8±2,2* (21,2-32) 31,5±6,0*	43,0±3,9* (20-56) 78,5±5,3*	40,7±6,3 (20-74) 61,5±6,3*
	>100	-	-	215,0±34,9 (180-284) 21,5±5,3	156,0±25,2* (131-181) 15,3±4,6*

Примечание: * - различие достоверно ($p < 0,05$) по отношению к контрольной группе
- в таблице представлены результаты 3-х экспериментов

В группе животных, иммунизированных АГ с препаратом «Ронколейкин (рЧИЛ-2)» при дозе АГ 0,83 мкг/мышь, количество животных с концентрацией АТ выше 100 мМЕ/мл составляло 21,5%, что в 1,3 раза больше, чем в контрольной группе, иммунизированной одним АГ - 16,7%. При дозе АГ 0,27 мкг/мышь в опытной группе у 15,3% животных концентрация АТ была выше 100 мМЕ/мл. В контрольной группе максимальные значения концентрации АТ находились в пределах от 20 до 100 мМЕ/мл.

Средние значения максимальных концентраций АТ (выше 100 мМЕ/мл) на 30 день эксперимента в опытной группе с рЧИЛ-1β составляли 368,0 и 158,5 мМЕ/мл, с рЧИЛ-2 – 215,0 и 156,0 мМЕ/мл, соответственно указанным дозам АГ. В контрольной группе животных, иммунизированных одним АГ, концентрация АТ была существенно ниже. Средняя концентрация АТ при дозе 0,83 мкг составляла 160,5 мМЕ/мл. При дозе 0,27 мкг/мышь максимальные концентрации АТ были в пределах от 20 до 100 мМЕ/мл (среднее значение - 42,7 мМЕ/мл).

В результате проведенных исследований на иммунодефицитных животных установлено, что частота выявления специфических АТ и средние значения концентрации АТ были значительно выше в группах животных, иммунизированных вакциной в сочетании с препаратами цитокинов, по сравнению с контрольными животными, иммунизированными одной вакциной.

В следующем разделе работы проанализированы результаты обследования животных с индуцированной иммуносупрессией, иммунизированных одним АГ, которые оставались серонегативными до 15 дня после первичной иммунизации. Контролем служили животные без иммуносупрессии. Животные опытной и контрольной групп были реиммунизированы АГ или АГ в сочетании с препаратом «Беталейкин (рЧИЛ-1β)». Концентрацию специфических АТ в исследуемых группах животных оценивали после реиммунизации (30 день эксперимента). Результаты представлены в таблице 5.

Как видно из таблицы 5, в опытной группе иммунодефицитных животных после реиммунизации одним АГ (доза 0,83 мкг) максимальные концентрации АТ находились в пределах от 20 до 100 мМЕ/мл, тогда как в контрольной группе выявлялись АТ выше 100 мМЕ/мл. Средние значения концентрации АТ в опытной группе составляли 45,0 мМЕ/мл, в контрольной - 297,2 мМЕ/мл.

После реиммунизации АГ в сочетании с рЧИЛ-1β в опытной группе иммунодефицитных животных появились АТ в концентрации выше 100 мМЕ/мл, и количество животных с указанной концентрацией АТ составляло 22,5%, что в 3,8 раза меньше по сравнению с контролем – 87,5%.

При реиммунизации АГ в дозе 0,27 мкг/мышь максимальные концентрации АТ в опытной группе находились в пределах от 20 до 100 мМЕ/мл и выявлялись у 50,0% животных, что в 1,4 раза меньше по сравнению с контролем – 70%. При использовании АГ в сочетании с рЧИЛ-1β в опытной группе максимальная концентрация АТ находилась в пределах от 20 до 100 мМЕ/мл, в контрольной - выше 100 мМЕ/мл. Средние значения концентрации АТ в опытных группах составили 21,9 мМЕ/мл (реиммунизация одним АГ) и 52,2 мМЕ/мл (реиммунизация АГ с рЧИЛ-1β). В контроле - 42,0 и 414,5 мМЕ/мл, соответственно указанным группам.

Таблица 5.

Оценка концентрации АТ на 30 день эксперимента у животных, которые остались серонегативными после первичной иммунизации вакциной против гепатита В

Иммунизация животных	Концентрация АТ (мМЕ/мл)	Средние значения концентрации АТ (мМЕ/мл) (Диапазон выявляемых показателей АТ) Количество животных с указанным уровнем АТ(%)			
		Реиммунизация животных			
		АГ		АГ + рЧИЛ-1β	
		0,83	0,27	0,83	0,27
АГ Контрольная (n = 60)	< 20	-	16,5±1,4 (15-19,5) 30,0±7,8	-	19,0±0,1 (17-19) 9,0±4,9
	20-100	65,0±16,2 (39-94) 42,8±8,4	42,0±4,5 (24-60) 70,0±7,8	28,0±2,0 (26-30) 12,5±5,6	52,2±7,9 (21-70) 54,5±8,5
	>100	297,2±131 (160-90) 57,2±8,4	-	597±66 (282-800) 87,5±5,6	414,5±139,2 (180-680) 36,5±8,2
ЦФ + АГ опытная (n = 58)	< 20	17,5±0,9 (16,3-20) 22,0±5,3	16,3±0,8 (15-19) 50,0±6,5*	19,3±0,3 (19-20) 39,5±6,3	18,2±0,8 (16-20) 37,5±6,3*
	20-100	45,0±18,0* (22-80) 78,0±5,3*	21,9±0,5* (20-23) 50,0±6,5*	46,0±15,3* (20-70) 38,0±6,3*	52,2±13,6 (22-85) 62,5±6,3*
	>100	-	-	240±121* (120-360) 22,5±5,4*	-

Примечание: * - различие достоверно ($p < 0,05$) по отношению к контрольной группе
- в таблице представлены результаты 3-х экспериментов

В результате проведенных исследований установлено, что средние значения концентрации АТ и частота встречаемости АТ в опытных группах иммунодефицитных животных были ниже по сравнению с животными контрольных групп без иммунодефицита. При реиммунизации АГ с рЧИЛ-1β интенсивность иммунного ответа была выше по сравнению с животными, реиммунизированными одним АГ. Уровень иммунного ответа иммунодефицитных животных в случае их реиммунизации АГ в сочетании с цитокинами приближался к уровню ответа животных без иммунодефицита, реиммунизированных одним АГ.

В следующей серии экспериментов проанализированы результаты обследования иммунодефицитных животных, изначально иммунизированных АГ в сочетании с препаратами цитокинов, которые оставались серонегативными до 15 дня после первичной иммунизации. Выделенные группы серонегативных животных реиммунизировали АГ или АГ в сочетании с препаратами цитокинов - «Беталейкин (рЧИЛ-1β)» или «Ронколейкин (рЧИЛ-2)» (опытные группы). Контролем служили иммунодефицитные животные, иммунизированные одним АГ. Концентрацию

специфических АТ оценивали после реиммунизации животных на 30 день эксперимента. Результаты исследования приведены в таблицы 6.

Как видно из таблицы 6, в опытной группе животных, иммунизированных АГ (доза 0,83 мкг) на фоне введения рЧИЛ-1β, после реиммунизации одним АГ у 6,3% животных выявлялись АТ в концентрации выше 100 мМЕ/мл, тогда как в контрольной группе максимальные значения концентрации АТ находились в пределах от 20 до 100 мМЕ/мл. При дозе 0,27 мкг/мышь максимальные концентрации АТ в исследуемых группах были в пределах от 20 до 100 мМЕ/мл, но частота выявления указанной концентрации АТ в опытной группе в 1,7 раза выше (87,5%) по сравнению с контрольной группой, иммунизированной одним АГ (50%).

После реиммунизации АГ в сочетании с рЧИЛ-1β, концентрация АТ в сравниваемых группах была выше 100 мМЕ/мл, при этом частота выявления АТ в группе животных с рЧИЛ-1β (доза 0,83 мкг) была в 1,5 раза выше (33,4%), по сравнению с контрольной группой иммунодефицитных животных (22,5%). Средняя концентрация АТ в опыте составила 288,0 мМЕ/мл, в контроле – 240,0 мМЕ/мл.

В группе животных, иммунизированных АГ (доза 0,83 мкг) с препаратом «Ронколейкин (рЧИЛ-2)», после реиммунизации одним АГ у 25% животных выявлялись АТ в концентрации выше 100 мМЕ/мл, тогда как в контроле максимальные значения концентрации АТ находились в пределах от 20 до 100 мМЕ/мл. Средние значения концентрации АТ в опыте - 142,0 мМЕ/мл, в контроле - 45,0 мМЕ/мл.

После реиммунизации АГ с рЧИЛ-2 в опытной группе частота выявления и средняя концентрация АТ была выше по сравнению с контрольной группой. Так при дозе 0,83 мкг после реиммунизации АГ с рЧИЛ-2 у 41,7% животных выявлялись АТ выше 100 мМЕ/мл, тогда как в контроле концентрация АТ находилась в пределах от 20 до 100 мМЕ/мл. Средние значения концентрации АТ в опыте составили 464,0 мМЕ/мл, в контроле - 45,0 мМЕ/мл.

При дозе АГ 0,27 мкг после реиммунизации животных АГ или АГ с рЧИЛ-2 отмечена аналогичная закономерность. У 45,4% животных концентрация АТ была выше 100 мМЕ/мл (средние значения концентрации АТ 190,1 мМЕ/мл). Тогда как в контроле максимальная концентрация АТ находилась в пределах от 20 до 100 мМЕ/мл (средние значения концентрации АТ 21,9 мМЕ/мл).

Оценка концентрации АТ в сыворотке крови на 30 день эксперимента у иммунодефицитных животных, которые оставались серонегативными после первичной иммунизации вакциной против гепатита В

Группы животных	Концентрация АТ (мМЕ/мл)	Средние значения концентрации АТ (мМЕ/мл) (Диапазон выявляемых показателей АТ)					
		Количество животных с указанным уровнем АТ(%)					
		Ресимунизация животных					
		АГ		АГ + рчИЛ-1β		АГ + рчИЛ-2	
		0,83	0,27	0,83	0,27	0,83	0,27
ЦФ+АГ (контроль) (n = 72)	< 20	17,5±0,9 (16,3-20) 22,0±5,3	16,3±0,8 (15-19) 50,0±6,5	19,3±0,3 (19-20) 39,5±6,3	18,2±0,8 (16-20) 37,5±6,3	-	-
	20-100	45,0±18,0 (22-80) 78,0±5,3	21,9±0,5 (20-23) 50,0±6,5	46,0±15,3 (20-70) 38,0±6,3	52,2±13,6 (22-85) 62,5±6,3	-	-
	>100	-	-	240±12,1 (120-360) 22,5±5,4	-	-	-
ЦФ + АГ + рчИЛ-1β (n = 70)	< 20	18,1±0,8 (16-20) 25,1±5,6	17,0±1,0 (16-18) 12,5±4,3*	19,0±0,6 (18-20) 16,6±4,8*	17,6±1,6 (16,0-19,2) 11,1±4,0*	-	-
	20-100	32,2±6,0 (22-80) 68,6±6,0	33,4±5,4* (21-98) 87,5±4,3*	64,8±8,4 (29-98) 50,0±6,5	51,0±6,5 (32-90) 61,2±6,3	-	-
	>100	143±11* (132-154) 6,3±3,1*	-	288±74,5** (141-567) 33,4±6,1**	192,0±31,2*** (138-306) 27,7±5,8***	-	-
ЦФ + АГ + рчИЛ-2 (n = 74)	< 20	-	17,9±0,4 (17,2-18,4) 30,0±5,9*	-	-	-	18,7±0,8 (18-20) 36,3±6,2*
	20-100	43,6±8,9 (21-94) 75,0±5,6	35,8±3,3* (26-45) 50,0±6,5	-	-	46,6±5,7 (30-78) 58,3±6,4*	45,0±3,0 (42-48) 18,3±5,0*
	>100	142,0±9,8* (134-141) 25,0±5,6*	113,5±11,5* (102-125) 20,0±5,2*	-	-	464±13,8*** (100-820) 41,7±6,4***	190,1±3,5*** (131-314) 45,4±6,4***

Примечание: * - различие достоверно (p<0,05) по отношению к контрольной группе

** - различие достоверно (p<0,05) между подгруппами животных, ресимунизированных АГ или АГ в сочетании с цитокинами

- в таблице представлены результаты 3-х экспериментов

В результате проведенных исследований установлено, что интенсивность иммунного ответа в группах иммунодефицитных животных, иммунизированных и реиммунизированных на фоне введения препаратов цитокинов, выше по сравнению с контрольной группой иммунодефицитных животных, иммунизированных одним АГ.

Таким образом, проведенные исследования показали, что исследуемые препараты цитокинов являются эффективными иммуноадьювантами, специфически усиливающими иммунный ответ экспериментальных животных при иммунизации вакциной против гепатита В. Наиболее демонстративно иммуноадьювантное действие цитокинов на интенсивность иммунного ответа при иммунизации вакциной против гепатита В в случае использования малых доз АГ проявляется на модели животных с индуцированной циклофосфаном иммуносупрессией, по сравнению с животными без иммуносупрессии. У животных с иммуносупрессией при первичной иммунизации АГ с цитокинами или реиммунизированных на фоне введения цитокинов, наблюдается более выраженный иммунный ответ по сравнению с животными, иммунизированными АГ без цитокинов. Отмечен более высокий уровень сероконверсии и большая частота встречаемости высоких концентраций специфических АТ. В случае использования исследуемых препаратов цитокинов как на этапе иммунизации, так и реиммунизации иммунодефицитных животных, уровень иммунного ответа приближается к уровню ответа животных без иммуносупрессии, иммунизированных одним АГ.

Результаты проведенных исследований определяют возможность использования лекарственных препаратов цитокинов не только с терапевтической целью, но также в качестве иммуноадьювантов для обеспечения формирования адекватного поствакцинального иммунного ответа, что наиболее значимо для лиц с проявлениями иммунодефицита.

Валидация методов определения специфической активности и разработка СО препаратов цитокинов - рчФНО α и рчФНО β .

Для контроля качества как коммерческих, так и вновь разрабатываемых лекарственных препаратов МИБП должны использоваться стандартизованные аттестованные методы. Это в полной мере относится к методам оценки специфической активности препаратов МИБП. Кроме того, при осуществлении контроля производственных процессов, а также контроля качества готовых лекарственных средств, необходимо использование стандартных образцов.

В настоящее время разрабатываются новые отечественные лекарственные препараты на основе рекомбинантных белков цитокинов человека. Одними из таких препаратов являются «Альнорин (рчФНО α)» и «Бефнорин (рчФНО β)». Для указанных препаратов выполнен полный объем доклинических исследований, в настоящее время они находятся на второй фазе клинических испытаний.

С целью обеспечения контроля их качества следующий раздел работы включал исследования по валидации методики определения специфической активности указанных препаратов цитокинов (рчФНО α и рчФНО β) и аттестации соответствующих ОСО.

Для определения повторяемости и воспроизводимости методики, оценки колебаний результатов анализа проводили исследования с разными схемами построения опытов - при одновременной постановке на одном и двух планшетах одного или нескольких образцов в одной лаборатории, а также в разные дни на разных планшетах нескольких образцов в двух лабораториях.

Исследования проведены в сравнении с Международными стандартными образцами, аттестованными «NIBSC» (Великобритания) – рчФНО α , активность 40 000 МЕ/мкг белка; рчФНО β , активность 150 000 МЕ/мкг белка.

В результате проведенного исследования валидированы методики определения специфической активности препаратов цитокинов - рчФНО α и рчФНО β . Используя валидированные методики, аттестованы два ОСО определения специфической активности соответствующих препаратов рчФНО α и рчФНО β . Аттестованная активность ОСО рчФНО α $3,1 \times 10^4 \pm 0,3 \times 10^4$ МЕ/мкг белка, коэффициент вариации 25,1%. Активность ОСО рчФНО β $6,8 \times 10^4 \pm 0,6 \times 10^4$ МЕ/мкг белка, коэффициент вариации – 19,1%.

Для определения срока годности ОСО рчФНО α и ОСО рчФНО β была проведена оценка стабильности препаратов методом ускоренного теста - при воздействии повышенных температурных режимов (37°C, 65°C, 95°C) в течении различных промежутков времени (от 5 часов до 6 недель). Контролем служили образцы препаратов рчФНО, хранившиеся при температуре от 2 до 8°C в течение 2 - 3,5 лет.

Проведенные исследования показали, что активность препаратов рчФНО α и рчФНО β под воздействием различных температурных и временных режимов не меняется. Результаты наших исследований согласуются с данными ВОЗ, касающихся стабильности стандартных образцов препаратов рчФНО. Согласно данным ВОЗ, специфическая активность стандартных образцов препаратов рчФНО снижается на 0,01% в течение одного года в условиях хранения при температуре от 2 до 8°C.

Установлен срок годности разработанных и аттестованных ОСО рчФНО α и ОСО рчФНО β - 3 года.

Оформлены и утверждены два Свидетельства и две Инструкции по применению - ОСО определения специфической активности рчФНО α (ОСО 42-28-400-08) и ОСО определения специфической активности рчФНО β (ОСО 42-28-401-08). Разработанные ОСО внесены в Реестр отраслевых стандартных образцов МИБП.

ВЫВОДЫ

1. На экспериментальных моделях установлено, что препараты цитокинового ряда «Беталейкин (рЧИЛ-1β)», «Ронколейкин (рЧИЛ-2)», «Аффинолейкин» и препарат «Имунофан» усиливают иммунный ответ животных при иммунизации вакциной против гепатита В.
2. Иммуноадаъювантное действие цитокинов на интенсивность иммунного ответа при иммунизации вакциной против гепатита В наиболее демонстративно проявляется на животных с индуцированной циклофосфаном иммуносупрессией.
3. При иммунизации или реиммунизации животных вакциной в сочетании с цитокинами, используемыми в виде монопрепаратов или комплекса, включающего «Беталейкин (рЧИЛ-1β)» и «Ронколейкин (рЧИЛ-2)», наблюдается более высокий уровень сероконверсии и частота выявления высоких концентраций специфических антител по сравнению с животными, иммунизированными без цитокинов.
4. У животных с индуцированной иммуносупрессией и без иммуносупрессии, иммунизированных и реиммунизированных вакциной против гепатита В в сочетании с цитокинами, уровень сероконверсии как на 15, так и на 30 сутки был существенно выше по сравнению с контрольной группой животных, иммунизированных вакциной без цитокинов.
5. Концентрация специфических антител у животных, иммунизированных и реиммунизированных вакциной с цитокинами, в 1,2 - 4,5 раза превышала уровень антител животных, иммунизированных без цитокинов.
6. Дозы вакцины, которые не индуцировали выработку антител, вызвали развитие иммунного ответа в случае их использования с цитокинами. Интенсивность иммунного ответа на малые дозы вакцины, используемой в сочетании с исследованными препаратами цитокинов, соответствует уровню ответа на большие дозы вакцины, вводимой без цитокинов.
7. Проведена валидация метода определения специфической активности препаратов рЧФНОα и рЧФНОβ с установлением следующих характеристик - воспроизводимости, повторяемости, линейности.
8. Разработаны два отраслевых стандартных образца определения специфической активности - ОСО рЧФНОα и ОСО рЧФНОβ. Составлены и утверждены нормативные документы - на ОСО рЧФНОα и ОСО рЧФНОβ (Свидетельства и Инструкции по применению соответствующих ОСО). Разработанные ОСО рЧФНОα (ОСО 42-28-400-08) и рЧФНОβ (ОСО 42-28-401-08) внесены в Реестр отраслевых стандартных образцов МИБП.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Никитина Т.Н. Стимуляция поствакцинального иммунного ответа препаратами цитокинов при иммунизации животных вакциной против гепатита В // *Материалы Всероссийской научной конференции молодых ученых. «Актуальные вопросы инфекционной патологии человека, клинической и прикладной иммунологии»*. Уфа. - 2004. - С. 67.
2. Никитина Т.Н. Иммуноадьювантное действие цитокинов / Авдеева Ж.И. // *Всероссийская научно-практическая конференция «Вакцинология 2006. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней»*. Москва. – 2006. - С. 73.
3. Никитина Т.Н. Препараты цитокинов как иммуноадьюванты при иммунизации вакциной «Энджерикс» / Авдеева Ж.И., Карпова Е.В. // *Шестая межд. конференция «Клинические исследования лекарственных средств»*. – 2007. - С. 82-83.
4. Авдеева Ж.И. Показатели клеточного иммунного ответа при иммунизации мышей антирабической вакциной на фоне цитокинов / Акользина С.Е., Алпатова Н.А., Никитина Т.Н., Медунцын Н.В. // *Цитокины и воспаление*. - 2008. - Т. 7, № 4. - С. 15-20.
5. Никитина Т.Н. Иммуноадьювантное действие цитокинов / Авдеева Ж.И. // *Биопрепараты*. – 2008. - № 1 (29). - С. 16-20.
6. Никитина Т.Н. Разработка ОСО фактора некроза опухолей альфа / Авдеева Ж.И., Петухов В.Г., Масычева В.И. // *Тезисы Всероссийской научно-практической конференции «Вакцинология 2008. «Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней»*. Москва. – 2008. - С. 91.
7. Никитина Т.Н. Иммуноадьювантное действие цитокинов при иммунизации животных вакциной против гепатита В / Авдеева Ж.И. // *Цитокины и воспаление*. – 2009. – Т. 8, № 1. – С. 28-31.
8. Никитина Т.Н. Цитокины как иммуноадьюванты / Авдеева Ж.И., Алпатова Н.А. // *Материалы XIII Всероссийского Научного форума с межд. участием им. акад. В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге»*. 8-12 июня 2009. *Мед. иммунология – 2009*. – Т. 11, № 4-5. – С. 328-329.
9. Авдеева Ж.И. Отраслевые стандартные образцы определения специфической активности препаратов рекомбинантных цитокинов человека / Петухов В.Г., Никитина Т.Н., Алпатова Н.А. // *Сб. Тр. X Межд. Конгресса. «Современные проблемы аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии»*, посвящ. 100-летию со дня рожд. акад. АМН А.Д. Адо, 20-23 мая 2009. Казань. – 2009. – С. 459-460.
10. Авдеева Ж.И. Влияние цитокинов на иммуногенные свойства вакцины против клещевого энцефалита / Акользина Н.А., Алпатова Н.А., Никитина Т.Н., Ращепкина М.Н., Медунцын Н.В. // *Цитокины и воспаление*. – 2009. - Т. 8, № 2. - С. 16-21.
11. Никитина Т.Н. Изучение иммуноадьювантного действия цитокинов на экспериментальных моделях / Авдеева Ж.И. // *Цитокины и воспаление*. - 2010. – Т. 9, № 2. - С. 31-34.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ - антиген

АТ - антитела

ВОЗ - Всемирная организация здравоохранения

ИФ - интерферон

ИЛ - интерлейкин

КСФ - колониестимулирующий фактор

МЕ - международная единица

МСО - международный стандартный образец

МИБП - медицинские иммунобиологические препараты

ОСО - отраслевой стандартный образец

рчИЛ-1 β - рекомбинантный ИЛ-1 β человека

ФНО - фактор некроза опухолей

ЦФ - циклофосфан

NIBSC - National Biological Standards Board

Отпечатано в ООО «КопиМастер»
119049, г. Москва, Калужская пл., д. 1
www.copymaster.biz; e-mail: info@copymaster.biz;
тел: (495) 229-56-62
Заказ № 106. Тираж 100 экземпляров.
08.05.2010 г.