

АЛПАТОВА Наталья Александровна

ЦИТОКИНЫ КАК АДЪЮВАНТЫ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ВАКЦИН

03.03.03 – иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва, 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор, академик РАН

Медуницын Николай Васильевич

Официальные оппоненты:

Логунов Денис Юрьевич, доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, заместитель директора по научной работе Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации;

Кадагидзе Заира Григорьевна, доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии опухолей Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации;

Сапожников Александр Михайлович, доктор биологических наук, профессор, руководитель лаборатории клеточных взаимодействий отдела иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук;

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии».

Защита состоится 26 февраля 2020 г. в 14-00 на заседании диссертационного совета Д208.017.01 на базе ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России по адресу 115522, г.Москва, Каширское шоссе, д.24

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России и на сайте <http://nrcii.ru/dissertatsionnyy-sovet/zashchity-dissertatsiy/>.

Автореферат разослан «___» _____ 20.. г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук

Гудима Г.О.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Несмотря на большие успехи в области разработки новых и совершенствования существующих вакцин, напряженность иммунитета, развивающегося после введения некоторых из них, недостаточно высока. Выраженность и характер формирующегося иммунного ответа при вакцинации зависят от генетических особенностей организма и его функционального состояния, особенностей антигенов и свойств вакцин, пути и схемы их введения [Plotkin S.A., 2010; Медуницын Н.В., 2010; Петров Р.В., Хаитов Р.М., 2011]. Следует отметить, что для некоторых инфекционных заболеваний до настоящего времени эффективные вакцины не разработаны. Особого внимания заслуживает вопрос иммунопрофилактики лиц с нарушением иммунного статуса, поскольку они наиболее подвержены инфекционным заболеваниям. К данной группе относится контингент с нарушением функционального состояния иммунной системы, пациенты с хронической патологией, лица пожилого возраста и др. Это требует совершенствования способов иммунопрофилактики и разработки новых вакцинных препаратов, обеспечивающих надежную защиту организма от инфекции. В связи с этим поиск путей усиления иммуногенных свойств вакцин для повышения эффективности вакцинации очень актуален.

Одним из способов повышения иммуногенности вакцин является использование адъювантов, стимулирующих развитие иммунного ответа. Целесообразность применения адъювантов заключается в увеличении иммуногенности антигенов, входящих в состав вакцин, изменении характера иммунного ответа, снижении количества вводимых антигенов, уменьшении кратности введения вакцин и повышении интенсивности иммунного ответа у лиц со сниженной иммунной активностью [Медуницын Н.В., 2010; Di Pasquale A. et al., 2015; Moyer T.J. et al., 2016]. При выборе адъюванта особое внимание уделяется его способности усиливать иммунологическую память.

В качестве клеточного субстрата при производстве многих противовирусных вакцин используются эпителиальные и фибробластные клеточные культуры, которые, предположительно, способны продуцировать цитокины. Было высказано предположение о возможном присутствии цитокинов в лекарственных препаратах, изготовленных на основе клеток эукариот [Gearing A.J.H. et al., 1989; Van Damme J. et al., 1989]. Учитывая широкий спектр иммунобиологической активности цитокинов и возможное их влияние на свойства препаратов, актуальным является изучение их присутствия в противовирусных вакцинах, а также способности клеточных культур, используемых в качестве субстрата при производстве вакцин, секретировать цитокины.

При разработке эффективных вакцин с адъювантами важен выбор модели, позволяющей оценить повышение иммуногенности вакцины с адъювантом по сравнению с вакциной без адъюванта. Предварительные исследования вакцины с адъювантом на животных позволяют выбрать безопасные и эффективные дозы, подобрать схемы иммунизации, способ введения, оценить эффективность, а также выявить непредвиденные или возможные нежелательные реакции, которые необходимо учитывать при планировании клинических исследований. Актуальным является разработка требований к изучению адъювантов и вакцин с адъювантами на этапе доклинических исследований.

В настоящее время биотехнологические лекарственные препараты на основе рекомбинантных цитокинов человека широко применяются для лечения ряда тяжелых хронических заболеваний. Перспективным является возможность использования указанных препаратов в качестве адъювантов для вакцинных препаратов, обеспечивающих защиту от инфекционных заболеваний. Производство лекарственных препаратов на основе рекомбинантных цитокинов требует выполнения специальных требований как к соблюдению условий производства, контролю критических этапов процесса производства, так и к методам контроля качества готового препарата. Актуальным является вопрос совершенствования нормативной базы для биотехнологических лекарственных препаратов, отражающей их особенности и включающей требования к ним на этапах разработки, оценки качества и доклинического изучения. Важным аспектом при разработке требований к указанным группам лекарственных средств является их гармонизация с требованиями нормативных документов стран с развитой регуляторной системой и рекомендациями ВОЗ.

Степень разработанности темы исследования

В качестве потенциальных иммуноадъювантов с конца 80-х годов прошлого столетия рассматриваются цитокины [Weinberg A. et al., 1988; Nunberg J.H. et al., 1989]. Участвуя в формировании и регуляции защитных реакций организма, цитокины вовлечены во все звенья иммунного ответа. Они являются основными гуморальными факторами воспаления, которые необходимы для реализации защитных функций врожденного иммунитета. Как медиаторы межклеточного взаимодействия, цитокины определяют направленность специфического иммунного ответа, способствуют формированию долговременной памяти [Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008; Ярилин А.А., 2010]. Использование цитокинов в качестве адъювантов может обеспечить снижение дозы вводимых антигенов и/или количество доз вакцины, необходимых для успешной иммунизации, а также стимулировать развитие протективного иммунитета у лиц с иммунной недостаточностью. В настоящее время имеются сообщения о положительных результатах оптимизации вакцинального процесса с помощью цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-12, ИЛ-15, ИФ γ , ФНО α , ГМ-КСФ) в экспериментальных и в немногочисленных клинических исследованиях [Schijns V.E. et al., 1994; Miquilena-Colina M.E. et al., 2009; Ben-Sasson S.Z. et al., 2011; Симбирцев А.С., с соавт., 2011; Li Y. et al., 2017; Chen T. et al., 2017; Mahdavi M. et al., 2017].

Цель исследования

Научное обоснование и экспериментальное подтверждение целесообразности использования препаратов рекомбинантных цитокинов (рчИЛ-1 β , рчИЛ-2, рчФНО α , тимозин альфа 1, гибридный белок «Неотим») и фактора переноса («Аффинолейкин») в качестве адъювантов с целью повышения иммуногенной эффективности противовирусных вакцин против бешенства, клещевого энцефалита, гепатита А и гепатита В.

Задачи исследования

1. Оценить влияние цитокинов (рчИЛ-1 β , рчИЛ-2, рчФНО α , тимозин альфа 1, гибридный белок «Неотим») и препарата «Имунофан» на показатели гуморального и клеточного иммунного ответа, а также на уровень протективного иммунитета экспериментальных животных при иммунизации против бешенства и клещевого энцефалита.

2. Изучить адъювантный эффект цитокинов (рчИЛ-1 β , рчИЛ-2, рчФНО α , тимозин альфа 1, гибридный белок «Неотим») на иммуногенную активность вакцины против гепатита А и оценить влияние указанных препаратов на показатели гуморального иммунного ответа.

3. Изучить влияние рчФНО α на иммуногенную активность конъюгированной вакцины против гепатита А.

4. Изучить адъювантное действие препаратов рчИЛ-1 β и рчИЛ-2, «Аффинолейкина» и препарата «Имунофан» на иммуногенную активность вакцины против гепатита В на моделях животных без иммуносупрессии и иммунодефицитных животных и оценить возможность преодоления специфической неотвечаемости с помощью цитокинов.

5. Оценить возможность развития иммунного ответа на антиген у мышей слабо отвечающей линии при стимуляции антиген-презентирующих клеток с помощью адъюванта на модели созревания клеток-эффекторов гиперчувствительности замедленного типа в условиях *in vitro*.

6. Оценить участие антигенов главного комплекса гистосовместимости класса II в развитии специфического иммунного ответа на вакцины при их сочетанном применении с цитокинами и определить зависимость степени выраженности иммунного ответа от изменения уровня экспрессии указанных антигенов на иммунокомпетентных, в том числе и антиген-презентирующих клетках, под влиянием цитокинов.

7. Исследовать содержание провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО α в противовирусных вакцинах (антирабической, полиомиелитной, коревой, против гепатита А).

8. Изучить способность различных клеточных культур, используемых в качестве субстратов при производстве противовирусных вакцин, продуцировать провоспалительные цитокины (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО α) спонтанно и при воздействии специфического антигена.

9. Усовершенствовать нормативную документацию, регламентирующую требования к оценке качества и проведению доклинических исследований лекарственных препаратов, полученных с использованием технологии рекомбинантных ДНК, а также к проведению доклинических исследований адъювантов и вакцин с адъювантами, гармонизируя ее с международными требованиями и рекомендациями ВОЗ.

Научная новизна

В работе представлено обоснование и экспериментальное подтверждение нового научного направления в цитокинотерапии – возможности применения лекарственных препаратов цитокинов в виде монопрепаратов или адъювантного комплекса для создания более эффективного поствакцинального иммунитета при вакцинации, в том числе и иммунокомпрометированных лиц, что расширяет представление о свойствах цитокинов и определяет их роль в профилактике инфекционных вирусных заболеваний.

Впервые при изучении адъювантных свойств рекомбинантных цитокинов (рчИЛ-1 β , рчИЛ-2, рчФНО α , тимозин альфа 1, гибридный белок «Неотим») на используемых экспериментальных моделях установлена их способность повышать иммуногенную активность вакцин против бешенства, гепатита А, гепатита В и клещевого энцефалита. Показано, что исследуемые цитокины повышают уровень титров специфических антител, обеспечивают более высокий уровень сероконверсии, стимулируют клеточный иммунный ответ и индуцируют формирование более эффективного протективного иммунитета, обеспечивая защиту экспериментальных животных при последующем заражении

возбудителем инфекции (вирусом бешенства или клещевого энцефалита), по сравнению с контрольными группами животных, иммунизированных одной вакциной. Комбинации цитокинов, необходимые для стимуляции иммунного ответа на исследованные вакцины, различаются по способности стимулировать формирование гуморального и/или клеточного иммунитета. Одним из механизмов, опосредующих адьювантное действие препаратов цитокинов, кроме непосредственного эффекторного действия цитокинов, является активация антиген-презентирующих клеток за счет повышения экспрессии антигенов гистосовместимости класса II под их влиянием.

Впервые показано, что введение вакцины в сочетании с препаратами цитокинов способствует преодолению специфической неответности при иммунизации иммунодефицитных животных и развитию иммунного ответа при введении минимальных доз вакцины, которые не проявляют иммунизирующий эффект без цитокинов.

Впервые показано, что противовирусные вакцины (антирабическая, полиомиелитная, коревая, против гепатита А), при производстве которых в качестве субстрата используются клетки млекопитающих, содержат провоспалительные цитокины (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО α).

Впервые установлена способность клеточных культур - первичной (почки зеленой мартышки), перевиваемой (4647), диплоидной (М-22), используемых в качестве субстрата при производстве вакцин, продуцировать цитокины спонтанно или при антигенной стимуляции. Интенсивность продукции цитокинов зависит от вида клеточной линии и использованного антигена.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты изучения иммуноадьювантных свойств цитокинов свидетельствуют о возможности их применения в качестве адьювантов противовирусных вакцин. Направленная стимуляция гуморального или клеточного поствакцинального иммунитета может быть достигнута с помощью подбора необходимых цитокинов, дозы и схемы их введения. Использование цитокинов позволяет снизить дозы вакцин без потери их иммуногенности.

Результаты исследований на различных моделях при использовании нормальных и иммунодефицитных животных свидетельствуют о возможном применении цитокинов в качестве иммуноадьювантов для стимуляции поствакцинального иммунитета у пожилых людей, а также у лиц со сниженной иммунной активностью, сопровождающей развитие хронических заболеваний.

Присутствие цитокинов в вакцинах свидетельствует о целесообразности оценки их содержания. Одним из критериев выбора субстрата при разработке новых противовирусных вакцин может быть изучение способности клеточных культур к спонтанной и антиген-индуцированной продукции цитокинов.

Требования к оценке качества и проведению доклинических исследований биотехнологических лекарственных препаратов, а также к проведению доклинических исследований адьювантов и вакцин с адьювантами, гармонизированные с международными требованиями, нашли отражение в разработанных документах. Совершенствование требований позволит обеспечить надлежащее качество указанных групп препаратов, а также эффективность и безопасность при их клиническом применении.

Методология и методы диссертационного исследования

В методологическую основу диссертационной работы вошло изучение и

структурирование данных отечественных и зарубежных источников по вопросам особенностей развития иммунного ответа на вакцины против бешенства, клещевого энцефалита, гепатита А и гепатита В, возможности использования цитокинов в качестве адъювантов для повышения иммуногенной активности противовирусных вакцин, оценка степени актуальности и разработанности темы. При проведении научных исследований, в соответствии с целью и задачами, были выбраны объекты исследования (противовирусные вакцины, рекомбинантные цитокины человека, препараты с иммуномодулирующей активностью) и комплекс методов исследования (биологические, иммунологические, вирусологические, иммунохимические, цитофлюориметрия).

Положения, выносимые на защиту

1. Препараты цитокинов (рчИЛ-1 β , рчИЛ-2, рчФНО α , тимозин альфа 1, гибридный белок «Неотим», фактор переноса) обладают иммуноадъювантными свойствами и различаются по способности стимулировать развитие гуморального и/или клеточного иммунного ответа. У экспериментальных животных (морские свинки, мыши) цитокины при сочетанном применении с вакцинами против бешенства, клещевого энцефалита, гепатита А индуцируют формирование более эффективного специфического иммунитета, в том числе и протективного, обеспечивая защиту экспериментальных животных при последующем заражении вирусами бешенства или клещевого энцефалита. Использование цитокинов позволяет снизить дозы вакцин без потери их иммуногенности.

2. Препараты цитокинов (рчИЛ-1 β и рчИЛ-2) при использовании в качестве адъювантов на экспериментальной модели *in vivo* способствуют преодолению специфической неотвечаемости на антиген. Применение рчИЛ-1 β и рчИЛ-2 индуцирует развитие иммунного ответа у нормальных животных при введении вакцины против гепатита В в дозах, на которые нет ответа без адъювантов, а также способствует развитию выраженного иммунного ответа у животных с индуцированной иммуносупрессией. Использование адъюванта способствует развитию иммунного ответа на конкретный антиген у мышей слабо отвечающей линии на модели *in vitro*.

3. Противовирусные вакцины (антирабическая, полиомиелитная, коревая, против гепатита А) содержат провоспалительные цитокины (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО α). Источником цитокинов в вакцинах являются клеточные культуры, используемые в качестве субстрата для изготовления вакцин. Клеточные культуры способны секретировать цитокины при обычных условиях культивирования или приобретают эту способность при стимуляции антигеном.

4. Цитокины являются перспективными адъювантами вакцин, в первую очередь, при вакцинации лиц с признаками иммунной недостаточности.

Степень достоверности результатов

Достоверность результатов диссертационного исследования обеспечена достаточным объемом экспериментальных исследований, выполненных с применением адекватных современных биологических, иммунологических и иммунохимических методов. Статистические методы обработки полученных данных соответствуют поставленным задачам, что позволяет считать результаты исследований достоверными. Сформулированные положения и выводы аргументированы и обоснованы.

Апробация результатов исследования

Основные положения диссертационной работы представлены и доложены на IV Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство», Москва, 1997; 5-ом Конгрессе «Современные проблемы аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии», Москва, 2002; XIII Всероссийском научном форуме «Дни иммунологии в С-Петербурге», С-Петербург, 2009; Всероссийской научно-практической конференции «Вакцинология 2010. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней», Москва, 2010; IV съезде фармакологов России «Инновации в современной фармакологии», Казань, 2012; XV Всероссийском научном Форуме с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в С-Петербурге», С-Петербург, 2015; XIV международной конференции «Высокие медицинские технологии XXI века», Испания, Бенидорм, 2015; XVI Всероссийском научном Форуме с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в С-Петербурге», С-Петербург, 2017; Всероссийской Конференции «Клиническая иммунология и аллергология – практическому здравоохранению», РААКИ, Москва, 2018 г.; Национальной Конференции «Клиническая иммунология и аллергология – междисциплинарные проблемы», Москва, 2019 г.

Внедрение результатов исследования

Требования к контролю качества биотехнологических лекарственных препаратов, разработанные с нашим участием, нашли отражение в ОФС 1.7.1.0007.15 «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК», ГФ РФ XIV издания.

Рекомендации по организации исследований и основные принципы оценки эффективности и безопасности при доклиническом изучении адъювантов и вакцин с адъювантами, а также биотехнологических лекарственных препаратов отражены в следующих Руководствах, разработанных с нашим участием:

1) Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты). – Москва: ПОЛИГРАФ-ПЛЮС, 2013. – т. II, 344 с., главы:

- «Основные требования к доклиническим исследованиям ИЛП»;
- «Исследование ИЛП на иммунологическую безопасность»;
- «Доклинические исследования препаратов, полученных с использованием методов генной инженерии»;
- «Доклинические исследования цитокинов и других иммуномодуляторов немикробного происхождения».

2) Руководство по экспертизе лекарственных средств. – Москва: Гриф и К, 2014. – т. III, 536 с., главы:

- «Адъюванты вакцин»;
- «Оценка качества биологических лекарственных препаратов, полученных с использованием рекомбинантной ДНК».

Рекомендации по организации исследований и основные принципы оценки эффективности и безопасности при доклиническом изучении адъювантов и вакцин с адъювантами отражены в Правилах проведения исследований биологических лекарственных

средств Евразийского экономического союза, глава 16. «Адьюванты вакцин для лечения и профилактики заболеваний человека» (утверждены 03.11.2016 г.).

Нормативные требования к оценке качества и рекомендации по изучению эффективности и безопасности при проведении доклинических исследований для указанных групп препаратов гармонизированы с требованиями международных документов и рекомендациями ВОЗ.

Результаты исследований, выполненных в рамках диссертационной работы, послужили обоснованием проведения клинических исследований по изучению эффективности вакцинации против гепатита В больных со спонтанной формой вторичного иммунодефицита и проявлениями инфекционного синдрома при включении в схему вакцинации в качестве адьюванта лекарственного препарата «Беталейкин (рчИЛ-1β), лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного и подкожного введения» (производитель ФГУП «ГосНИИ ОЧБ» ФМБА России, г. С-Петербург). Данные, полученные в клинических исследованиях, подтверждают результаты экспериментальных исследований и свидетельствуют о формировании более выраженного поствакцинального иммунитета у лиц с указанной патологией при проведении вакцинации на фоне цитокинов (Акт внедрения от 04.04.2019 г).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Область исследования диссертационной работы соответствует формуле специальности «03.03.03 – иммунология» (биологические науки), а именно пункту 2 «Изучение механизмов распознавания чужеродных субстанций, их удаления из организма», пункту 3 «Установление особенностей осуществления иммунной защиты от различных типов патогенов», пункту 6 «Разработка фундаментальных основ иммунопрофилактики, иммунодиагностики и иммунотерапии».

Работа выполнялась в рамках научно-исследовательских работ, проводимых ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России в 2012-2018 гг.:

«Научное обоснование методов оценки качества, эффективности и безопасности иммунобиологических лекарственных препаратов и их стандартизация» (№ ГР 01201275293); «Разработка и совершенствование научно-методических критериев экспертной оценки, стандартизации и принципов планирования, проведения и оформления результатов исследований отдельных групп лекарственных средств» (№ ГР 115111740005); «Научное обоснование перспективных направлений совершенствования иммунобиологических лекарственных препаратов, предназначенных для иммунопрофилактики инфекционных болезней» (№ ГР ААА-А18-118021590046-9); «Научное обоснование перспективных направлений совершенствования методологии экспертизы лекарственных средств» (№ ГР ААА-А18-118021590049-0).

Личный вклад автора

Личное участие автора осуществлялось на всех этапах диссертационного исследования и заключалось в подготовке обзора литературы по изучаемой научной проблеме, разработке дизайна и планировании научных исследований, их проведении, анализе и интерпретации полученных данных, оформлении научных публикаций по результатам исследований, разработке нормативных документов.

Исследования по изучению стимулирующего действия препаратов на иммуногенность вакцин выполнены непосредственно автором и при его участии с сотрудниками лаборатории иммунологии д.м.н. Авдеевой Ж.И., к.м.н. Акользиной С.Е., к.м.н. Никитиной Т.Н. Заражение экспериментальных животных фиксированным вирусом бешенства и вирулентным штаммом вируса клещевого энцефалита при проведении исследований по изучению протективного эффекта соответствующих вакцин проводилось совместно с сотрудниками специализированных лабораторий. Личный вклад автора в исследование составляет 85 %.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 50 научных работ, из которых 20 статей в научных журналах, которые включены в перечень рецензируемых периодических научных изданий, рекомендованных для публикации результатов кандидатских и докторских диссертаций, в том числе 8 статей – в журналах, входящих в базу Scopus; 3 статьи – в научных периодических изданиях; 27 публикаций в материалах научных форумов и конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 277 страницах, состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной описанию материалов и методов исследования, 11 глав собственных исследований, обсуждения результатов и выводов. Библиографический указатель включает 435 источников, в том числе 69 отечественных и 366 зарубежных. Диссертация иллюстрирована 30 рисунками и 38 таблицами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Материалы и методы

1.1. Изучение адьювантных свойств цитокинов

1.1.1. Материалы

Вид и количество экспериментальных животных, на которых были проведены исследования, отражено в таблице 1.

Таблица 1 - Лабораторные животные, используемые в исследованиях

Вид Животных	Линия	Вес (г)	Количество животных
Мыши беспородные белые		7-8, 12-14	2476
Мыши линейные	Balb/c	14-16, 18-20	3426
	СВА	14-16, 18-20	890
	С57В1/6	18-20	80
Морские свинки		250-300	148
Кролики	шиншилла	3,0 – 3,5 кг	10

Животные приобретены в питомнике Филиал «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России, после поступления в виварий в течение 7 сут находились на карантине. Условия содержания животных соответствовали указаниям СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)».

При формировании групп во всех экспериментальных исследованиях в качестве критерия отбора использовали показатель массы тела животных, учитывая, что его значения не отклоняются от среднего более, чем на 10 %.

Заражение экспериментальных животных фиксированным вирусом бешенства (штамм CVS) и вирулентным штаммом вируса клещевого энцефалита (тест-штамм «Абсеттаров») проводили с соблюдением СП. 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» и СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».

Противовирусные вакцины, используемые при изучении адьювантных свойств цитокинов, представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Вакцины, используемые при изучении цитокинов в качестве адьювантов

Наименование вакцины	Характеристика вакцины	Производитель
КОКАВ	культуральная антирабическая вакцина концентрированная и очищенная, инактивированная, сухая	ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», г. Москва
КАВ	культуральная антирабическая вакцина инактивированная сухая	ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», г. Москва; ФГУП НПО «Микроген», филиал НПО «Имунопрепарат», г. Уфа
ВКЭ	вакцина против клещевого энцефалита культуральная очищенная концентрированная инактивированная сухая (штамм «Софьин»)	ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», г. Москва
Engerix B	вакцина против гепатита В рекомбинантная, адсорбированная	«GlaxoSmithKline», Бельгия
Геп-А-ин-ВАК	вакцина против гепатита А культуральная концентрированная очищенная инактивированная адсорбированная жидкая	ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», филиал ИМБТ г. Бердск
Конъюгированная вакцина против гепатита А (экспериментальная)	АГ вируса гепатита А (25 нг) конъюгирован с 2,5 мкг Полиоксидония (ПО) с добавлением лекарственной формы ПО (1000, 200 и 40 мкг)	ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», филиал ИМБТ г. Бердск; ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, г. Москва

В качестве адьювантов выбраны препараты цитокинов рчИЛ-1 β , рчИЛ-2, рчФНО α , тимозин альфа 1, гибридный белок «Неотим» и «Аффинолейкин» (фактор переноса). Провоспалительные цитокины ИЛ-1 β и ФНО α , являясь эндогенными медиаторами, играют основную роль в развитии и поддержании иммунного воспаления, в регуляции иммунного ответа на всех его этапах; влияют на созревание антиген-презентирующих клеток, в первую очередь дендритных, которые инициируют развитие адаптивного иммунного ответа. ИЛ-2, являясь ростовым фактором для Т- и В-лимфоцитов, необходим для их пролиферации и активации. Тимозин альфа 1, как медиатор тимического происхождения, влияет на созревание и дифференцировку Т-лимфоцитов, повышает активность НК-клеток. Гибридный белок «Неотим», состоящий из молекулы рчФНО α , на обоих концах которой присоединен

тимозин альфа 1, обладает иммуномодулирующим действием двух медиаторов. Фактор переноса повышает иммуногенность чужеродных АГ, а также содержание $\gamma\delta$ -Т-клеток, играющих важную роль в ранней противоинойфекционной защите.

Препараты цитокинов и препараты с иммуномодулирующей активностью, используемые в качестве адъювантов, представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Препараты, используемые в качестве адъювантов

Наименование препарата	Производитель
«Беталейкин, лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного и подкожного введения», действующее вещество - интерлейкин-1 бета человека рекомбинантный (рЧИЛ-1 β)	ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА России, г. Санкт-Петербург
«Ронколейкин, раствор для внутривенного и подкожного введения», действующее вещество - интерлейкин-2 человека рекомбинантный (рЧИЛ-2)	ООО НПК «БИОТЕХ», г. Санкт-Петербург
Фактор некроза опухоли альфа человека рекомбинантный (рчФНО α)	ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», филиал ИМБТ г. Бердск; ФБУН ГНЦ ПМБ, г. Оболенск
Тимозин альфа 1 человека рекомбинантный (рчТ α)	ФБУН ГНЦ ПМБ, г. Оболенск
Гибридный белок «Неотим», состоящий из рчФНО α и тимозина альфа 1, рекомбинантный (Т α -ФНО-Т α)	ФБУН ГНЦ ПМБ, г. Оболенск
«Аффинолейкин, лиофилизат для приготовления раствора для подкожного введения» (фактор переноса)	Пермский Филиал ФГУП НПО «Микроген»
«Имунофан, раствор для внутримышечного и подкожного введения» - препарат сравнения (препарат с иммуномодулирующей активностью)	ООО НПП «Бионокс», г. Москва
Полиоксидоний (ПО) – синтетический полиэлектролит, сополимер N-окси-1,4-этиленпиперазина и (N-карбоксо)-1,4-этиленпиперазиния бромид (препарат с иммуномодулирующей активностью)	ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, г. Москва

Дозы цитокинов, используемых в качестве адъювантов, выбраны на основании данных литературы и результатов собственных предварительных исследований. Препараты рЧИЛ-1 β , рчТ α и Т α -ФНО-Т α использованы в дозах от 5 до 1500 нг; рЧИЛ-2 и рчФНО α – от 10 до 10000 Ед на животное (мыши или морские свинки); «Аффинолейкин» (фактор переноса) – в дозе 1,0 ед/мышь; «Имунофан» – от 0,05 до 1,5 мкг на животное (мыши или морские свинки). Цитокины вводили животным в виде монопрепаратов или в комплексе, включающим несколько цитокинов.

Схема изучения адъювантного действия цитокинов на иммуногенную активность вакцин представлена на рисунке 1.



Рисунок 1 – Схема изучения адьювантного действия цитокинов на иммуногенную активность противовирусных вакцин

При изучении влияния адьювантов на уровень экспрессии продуктов генов гистосовместимости и выраженность иммунного ответа в качестве антигена (АГ) использовали овальбумин (OVA) отечественного производства. В работе также использовали полипептид (Т,Г)-А-Л – синтетический разветвленный сополимер L-тирозина, L-глутаминовой кислоты, DL-аланина, L-лизина с мол. массой 282 кДа («Miles Lab. Inc.», США) и конъюгат (Т,Г)-А-Л с ПО, полученный методом ковалентного связывания (весовое соотношение 1:10). Указанный конъюгат был любезно предоставлен Н.Г. Пучковой (ФГБУ ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, г. Москва).

1.1.2. Схемы иммунизации экспериментальных животных

При выполнении работы использованы схемы введения и разведения препаратов, применяемые при оценке качества противовирусных вакцин по показателям «Специфическая активность» / «Иммуногенная активность». В каждую исследуемую группу входило от 10 до 15 животных, каждый вид исследований включал не менее трех независимых экспериментов.

Схема иммунизации антирабической вакциной

Влияние цитокинов на показатели гуморального и клеточного иммунного ответа, а также на протективный эффект антирабических вакцин (КОКАВ, КАВ), оценивали в тесте защиты беспородных белых мышей от заражения фиксированным вирусом бешенства (штамм CVS). Применяли две схемы иммунизации и заражения экспериментальных животных.

В соответствии со схемой профилактической иммунизации, вакцину и цитокины вводили мышам одновременно внутрибрюшинно (в/бр) в объеме 0,5 мл, двукратно с интервалом в одну неделю. Использовали две серии разведений вакцины 1:25, 1:125, 1:625 и 1:50, 1:500, 1:5000. Вирус бешенства вводили на восьмые сутки после завершения иммунизации. Заражающая доза фиксированного вируса бешенства при внутримозговом

введении составляла 3,0-3,6 lg LD₅₀/0,03 мл. Наблюдение за животными проводили в течение 14 сут, отмечая гибель с 6 сут после заражения.

В соответствии со схемой лечебной иммунизации, эксперимент начинали с заражения мышей путем внутримозгового введения фиксированного вируса бешенства в дозе 0,6-0,9 lg LD₅₀/0,03 мл. Одновременно с заражением проводили первую иммунизацию мышей вакциной КАВ по 0,1 мл подкожно (п/к), в сочетании с адьювантами. Вакцину и адьюванты вводили в течение пяти сут с интервалом в 24 ч. Использовали цельную вакцину и ее разведения (1:4, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512). Адьюванты вводили животным п/к в объеме 0,5 мл, в дозах для рЧИЛ-1β - 200 нг/мышь, «Имунофана» - 50 нг/мышь.

Схема иммунизации вакциной против клещевого энцефалита

Стимулирующее действие цитокинов на иммуногенность вакцины против клещевого энцефалита (ВКЭ) оценивали в экспериментах на мышах линии Balb/c по влиянию на показатели клеточного и гуморального иммунного ответа, а также на протективный эффект в тесте защиты мышей против заражающей дозы вируса клещевого энцефалита.

Вакцину вводили в/бр в разведениях 1:10, 1:32, 1:100, 1:320 трехкратно с интервалом в одни сутки в объеме 0,5 мл; цитокины - п/к в объеме 0,5 мл, одновременно с вакциной. На 9-е сут после иммунизации животных заражали вирулентным штаммом вируса клещевого энцефалита (тест-штамм "Абсеттаров"), который вводили в/бр. Титр вируса был в пределах 8,5-9,2 lg LD₅₀/0,25 мл.

Схема иммунизации вакциной против гепатита А

Исследования проводили на двух экспериментальных моделях (морские свинки и беспородные мыши) с использованием двух видов вакцины против гепатита А.

Влияние цитокинов на иммуногенную активность вакцины Геп-А-ин-ВАК оценивали по числу сероположительных животных и уровню титров специфических антител (АТ) к вирусу гепатита А (ВГА). Цитокины и вакцину вводили морским свинкам одновременно (трехкратно с интервалом в две недели), при этом вакцину вводили в дозах 60-70 и 120 ЕД активности АГ ВГА по 0,5 мл при первой и второй иммунизации - внутримышечно, при третьей - п/к, а цитокины - п/к, в объеме 0,5 мл. Эффективность иммунизации оценивали в динамике на 14-е сут после 2-го и 3-го введения препаратов.

Изучение адьювантного действия рЧНОα на иммуногенную активность конъюгированной вакцины против гепатита А проводили на беспородных белых мышах, которых иммунизировали однократно. Для иммунизации использовали полуфабрикат (конъюгированная вакцина без добавления лекарственной формы ПО) и три серии конъюгированной вакцины в сочетании с лекарственной формой ПО (1000, 200 и 40 мкг/мышь). Препарат рЧНОα вводили п/к в дозе 100 Ед/мышь, в объеме 0,5 мл, одновременно с полуфабрикатом или вакциной, которые вводили в/бр в объеме 0,5 мл как цельные, так и в разведениях 1:2, 1:4, 1:8, 1:16.

Схема иммунизации вакциной против гепатита В

Исследования проводили на мышах линии Balb/c как нормальных (без иммуносупрессии), так и с индуцированной иммуносупрессией. Использовали несколько доз вакцины (0,83, 0,27, 0,09, 0,03, 0,01 мкг/мышь), которые вводили в/бр в объеме 0,5 мл, однократно или двукратно с интервалом в две недели (15 и 30 сут эксперимента). Цитокины

вводили п/к, одновременно с вакциной. Оценка интенсивности иммунного ответа проводили в динамике по частоте сероконверсии (в %).

Для создания и поддержания иммунодефицитного состояния животным перед иммунизацией и реиммунизацией ежедневно в течение 3-х сут в/бр по 1 мг/мышь в объеме 0,5 мл вводили циклофосфан (ЦФ) (ОАО «Биохимик», г. Саранск). Состояние иммуносупрессии оценивали по снижению количества нейтрофилов и лейкоцитов в периферической крови животных.

1.1.3. Методы изучения гуморального иммунного ответа

Выраженность гуморального иммунного ответа оценивали по уровню в сыворотке крови иммунизированных животных вируснейтрализующих АТ к вирусу бешенства, гемагглютинирующих АТ к вирусу клещевого энцефалита и специфических АТ к вирусам гепатита А и гепатита В.

Определение вируснейтрализующих антител к вирусу бешенства

Титр вируснейтрализующих АТ в сыворотке крови определяли в реакции биологической нейтрализации (РБН) на беспородных белых мышах, массой 7-8 г. Забор крови проводили на 7-е сут после иммунизации. При постановке реакции использовали постоянную дозу фиксированного вируса бешенства, штамм CVS (38 LD₅₀) и 5-кратные разведения инактивированной сыворотки. Смесь равных объемов тестируемой сыворотки и вируссодержащей жидкости инкубировали в течение 1,5 ч при температуре 37 °С и далее вводили в мозг экспериментальных животных в объеме 0,03 мл. Наблюдение за мышами проводили в течение 14 сут, учитывая их гибель с 6 сут после заражения.

Определение гемагглютинирующих антител к вирусу клещевого энцефалита

Титр гемагглютинирующих АТ определяли в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с использованием 0,4 % свежеполученной суспензии гусиных эритроцитов и коммерческого диагностикума вируса клещевого энцефалита из штамма 139 (ФГУП НПО «Микроген», филиал НПО «Вирион», г. Томск). Забор крови проводили на 8-е сут после иммунизации. Тестирование проводили микрометодом РТГА при температуре 4 °С с 2-кратным разведением сывороток и одной дозой АГ (8 АЕ). Реакцию учитывали через 18-20 ч.

Определение антител к вирусу гепатита А

Титр специфических АТ к ВГА определяли с помощью иммуноферментного анализа, используя коммерческие тест-системы («ИФА-анти-ВГА» НПО «Диагностические системы» г. Нижний Новгород и «Вектогеп А-антитела» ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор", филиал ИМБТ г. Бердск, ЗАО «Вектор-Майстар», г. Новосибирск). Чувствительность тест-систем составляла 10-20 мМЕ/мл по отношению к международному стандарту иммуноглобулина G к ВГА. Сероположительными считались сыворотки, титр АТ к ВГА в которых был выше 1:10.

Определение антител к вирусу гепатита В

Определение суммарных АТ к HBsAg проводили с использованием коммерческой иммуноферментной тест-системы «ВектоHBsAg-антитела-стрип» (ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск) в соответствии с указаниями инструкции по применению.

Забор крови у экспериментальных животных проводили из ретроорбитального синуса через 15 сут после первой иммунизации и тотально через 15 сут после повторного введения вакцины и адъювантов. Свежие образцы сывороток хранили при температуре от 2 до 8 °С не более одной недели, далее образцы замораживали и хранили при температуре минус 20 °С.

1.1.4. Методы изучения клеточного иммунного ответа

Состояние клеточного иммунитета оценивали по количественному содержанию в селезенке мышей Т-хелперов и Т-клеток с цитотоксической / супрессорной активностью, Т- и В-лимфоцитов, а также по функциональной активности лимфоцитов в реакции бласттрансформации (РБТЛ) и на модели индукции формирования клеток-эффекторов ГЗТ и их тестирования в условиях *in vitro* по способности продуцировать фактор торможения миграции макрофагов (МИФ).

Цитотоксический тест

При проведении теста использовали кроличьи иммуноглобулины, специфичные к Т- и В-лимфоцитам мыши, и комплемент кролика (ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, г. Москва). Суспензию тестируемых лимфоцитов (1×10^7 кл/мл), кроличьи иммуноглобулины, комплемент кролика вносили в лунки микропланшетов и инкубировали при температуре 37 °С в течение 25-30 мин. Подсчитывали число погибших клеток, вычисляли их процентное содержание от общего количества клеток и цитотоксический индекс.

Реакция бласттрансформации лимфоцитов

1. Для постановки реакции использовали оптимальные концентрации специфических АГ (антирабическая вакцина, вакцина против клещевого энцефалита) или митогенов (ФГА - 10 мкг/мл, Кон А - 10 мкг/мл, «Sigma», США). Лимфоциты селезенки мышей (концентрация 1×10^6 кл/мл в среде RPMI 1640 с соответствующими добавками) культивировали в течение 72 ч при температуре 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. За 16 ч до окончания культивирования вносили ³H-тимидин (74 кБк/мл). Пролиферативный ответ оценивали по интенсивности синтеза ДНК. Счет радиоактивности проводили на β-счетчике «BetaTrak», уровень пролиферации оценивали по числу импульсов в минуту.

2. Изучение антиген-специфической пролиферации проводили с использованием Т-лимфоцитов селезенки мышей, выделенных на 8-е сут после иммунизации OVA, и макрофагов интактных животных, предварительно обработанных OVA (доза 25 мкг/мл) в условиях *in vitro*. Лимфоциты (400 тыс.) и макрофаги (20 тыс.) вносили в лунки 96-луночных планшетов и культивировали в среде RPMI 1640 с соответствующими добавками в течение 72 ч при температуре 37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5 % CO₂. За 16 ч до окончания культивирования вносили ³H-тимидин. Счет радиоактивности проводили на β-счетчике «BetaTrak». Контролем служил уровень радиоактивности в лунках, в которых лимфоциты культивировали без добавления макрофагов, обработанных АГ.

Реакция непрямой иммунофлюоресценции

Количественное содержание Т-хелперов и Т-лимфоцитов с цитотоксической / супрессорной активностью, уровень экспрессии АГ ГКГ класса II (субрайонов-IA и -IE комплекса H-2 мыши) на иммунокомпетентных клетках определяли с использованием соответствующих специфических моноклональных АТ (МкАТ) (анти-L3T4 и анти-Thy1,2 («Becton Dickinson», США), а также супернатантов гибридом 10-2.16 (анти-IA^k) и 13/4 (анти-IE^k), МК-D6 (анти-IA^d) и 14-4-45 (анти-IE^d), 25-9-17S11 (анти-IA^b)), обладающих стабильной активностью (в титрах не менее 1:20) в тестах иммунофлюоресценции.

Гибридомы МК-D6 (анти-IA^d), 14-4-45 (анти-IE^d) и 25-9-17S11 (анти-IA^b) были любезно предоставлены д.м.н., профессором А.Ю. Барышниковым (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина», НИИ ЭДиТО).

При постановке реакции в качестве вторичных АТ использовали МкАТ или F(ab)₂-фрагменты кроличьих АТ, специфичных к иммуноглобулинам мыши, меченные FITC («Becton Dickinson», США). Определение количества клеток, экспрессирующих указанные маркеры, проводили на лазерном проточном цитофлюориметре «Epics C» («Coultronics», Франция).

Модель индукции эффекторов ГЗТ в условиях in vitro

При изучении участия АГ ГКГ класса II в формировании клеток, образующих МИФ на OVA, использовали модель индукции эффекторов ГЗТ в условиях *in vitro*. Из селезенки интактных мышей выделяли субпопуляции макрофагов и лимфоцитов. Макрофаги, используемые в качестве антиген-презентирующих клеток, инкубировали с OVA в течение 1,5 ч при температуре 37 °С, промывали, добавляли лимфоциты и культивировали в течение 5 сут. Далее сенсibilизированные в условиях *in vitro* эффекторы ГЗТ оценивали на присутствие МИФ-продуцентов в реакции торможения миграции макрофагов.

Определение МИФ-продуцентов

Тестирование клеток, образующих МИФ, индуцированных в условиях *in vitro*, проводили с помощью прямого комбинированного капиллярного теста. В качестве клеток-индикаторов для МИФ использовали клетки перитонеального экссудата (КПЭ) интактных мышей сингенной линии. При постановке теста капилляры отечественного производства с внутренним диаметром 0,4 мм заполняли осадком КПЭ, содержащим 15 % лимфоцитов, сенсibilизированных OVA в условиях *in vitro*. Клетки культивировали в течение 18-20 ч в среде с добавлением АГ. Зону миграции определяли путем измерения диаметров на микроскопе («Diavert-Leitz», Германия) с помощью оптического микрометра, рассчитывали площадь миграции клеток. Результаты оценивали по проценту миграции, рассчитанному по отношению к контролю (миграция клеток в среде без АГ).

1.1.5. Определение уровня экспрессии АГ ГКГ класса II

В исследованиях использовали субпопуляции клеток селезенки экспериментальных животных, а также клетки лимфоидной неоплазмы мышей линии P388D1, представленной в каталоге Российской коллекции клеточных культур (ФГБУН ИНЦ РАН, РККК/П, г. Санкт-Петербург).

Субпопуляции макрофагов и лимфоцитов выделяли из спленоцитов при их инкубации в течение 1-1,5 ч на пластиковых чашках Петри в среде RPMI 1640 с добавлением 10 % инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки при температуре 37 °С в атмосфере 5 % CO₂.

Для повышения уровня экспрессии АГ класса II препараты ИФγ в дозах 50 и 100 Ед/мл (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», г. Москва) добавляли к суспензии клеток в среде RPMI 1640 с 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и соответствующими добавками, далее культивировали в течение 36-48 ч при температуре 37 °С в атмосфере 5 % CO₂.

Для блокады АГ класса II на поверхности антиген-презентирующих клеток использовали анти-Ia-МкАТ (анти-IA^k- и анти-IE^k-, анти-IA^d- и анти-IE^d), аффинно-очищенные на колонке Сефарозы 4В, конъюгированной с кроличьими иммуноглобулинами, специфичными к иммуноглобулинам мыши.

1.1.6. Определение содержания цитокинов в противовирусных вакцинах и субстратах, используемых для получения вакцин

Исследованные культуральные вакцины (с указанием субстратов):

1) полиомиелитная вакцина (поливалентная) типов 1, 2, 3 из штаммов Себина, культивируемых на первичной культуре клеток почек зеленых мартышек (ПЗМ), живая пероральная жидкая;

2) полиомиелитная моновакцина 1 типа, приготовленная на клеточной культуре ПЗМ, живая;

3) полиомиелитная моновакцина 2 типа, приготовленная на клеточной культуре ПЗМ живая;

4) полиомиелитная моновакцина 3 типа, приготовленная на клеточной культуре ПЗМ, живая. Все вышеуказанные полиомиелитные вакцины произведены ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», г. Москва;

5) полиомиелитная вакцина (поливалентная) типов 1, 2, 3 из штаммов Себина, культивируемых на перевиваемой линии клеток почек зеленых мартышек (VERO), живая пероральная жидкая («Pasteur Merieux», Франция);

б) коревая вакцина из штамма «Ленинград-16», культивируемого на диплоидной культуре клеток фибробластов легкого человека (Л-68), живая сухая (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», филиал ИМБТ г. Бердск).

Изучены субстраты, используемые для производства противовирусных вакцин, по их способности к продукции цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО α (спонтанной и индуцированной вирусом полиомиелита 1, 2, 3 типов):

- первичная клеточная культура почек зеленых мартышек (ПЗМ);
- перевиваемая линия клеток почек зеленых мартышек (4647);
- диплоидная клеточная линия фибробластов кожи и мышцы эмбриона человека (M-22).

Определение уровня ИЛ-1 β в исследуемых препаратах проводили с использованием иммуноферментной тест-системы с чувствительностью 20-50 пг/мл (ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА России, г. Санкт-Петербург).

Активность ИЛ-6 определяли биологическим методом на клетках мышинной гибридомы В.9.9, чувствительной к ИЛ-6 (Aarden L.A. et al., 1987). Уровень пролиферативного ответа клеток оценивали с помощью радиометрического метода. Активность ИЛ-6 рассчитывали по отношению к международному стандартному образцу ИЛ-6 человека рекомбинантному (88/514, NIBSC, Англия) методом пробит-анализа.

Уровень ФНО α в исследуемых образцах определяли с помощью иммуноферментной тест-системы с чувствительностью 15-30 пг/мл (ГУ «РНПЦ ТиМБ» г. Минск, Республика Беларусь).

Для оценки активности ФНО α использовали биологический тест, определяя цитолитическое действие цитокина на клетки линии L-929, чувствительные к ФНО α (Matthews N. et al., 1987). Для определения подлинности ФНО α в исследуемых препаратах проводили реакцию нейтрализации сывороткой, специфичной к ФНО α .

Статистическая обработка результатов

Систематизация полученных результатов проведена с использованием электронных таблиц Microsoft Office Excel 2010. Проверку нормальности распределения переменных проводили с использованием критерия Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk's) (при числе исследуемых $n < 50$), Колмогорова-Смирнова ($n > 50$). Для определения межгрупповых различий независимых выборок и оценки их статистической значимости при нормальном распределении применяли непарный t-критерий Стьюдента. Для оценки различий количественных величин и относительных величин использовали соответствующие формулы; результаты выражали как среднее арифметическое или среднее геометрическое значение анализируемых показателей с расчетом ошибки средней величины. Различия считали статистически значимыми, если значение p не превышало 0,05. Статистический анализ проводили с использованием персонального компьютера и программного обеспечения Microsoft Office Excel, Statistica 6.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Изучение адъювантных свойств цитокинов при иммунизации животных вакциной против бешенства

При профилактическом использовании цитокинов в сочетании с КОКАВ, препараты вводили мышам до их заражения фиксированным вирусом бешенства (штамм CVS). Схема иммунизации представлена на рисунке 2.



Рисунок 2 – Схема эксперимента при профилактической иммунизации против бешенства

Протективный эффект оценивали, определяя процент выживших животных в каждой из групп, соответствующих разведению вакцины, и величину предельно допустимого разведения вакцины, обеспечивающую 50 % выживаемость животных после заражения вирусом бешенства, рассчитанную по методу Reed-Muench (PP_{50}). До заражения проведена оценка уровня вируснейтрализующих АТ и показателей клеточного иммунного ответа.

При введении КОКАВ в сочетании с одним из монопрепаратов цитокинов (рЧИЛ-1β, рчФНОα, рчТа или Та-ФНО-Та) установлено, что эффективность иммунизации животных вакциной повышается в случае применения в качестве адъювантов рчФНОα или рчЧИЛ-1β. В указанных группах отмечено увеличение выживаемости экспериментальных животных в 1,2-

1,8 раза по сравнению с контролем. При введении рчТ α или Т α -ФНО-Т α показатель ПР₅₀ был на уровне контрольной группы, иммунизированной вакциной без цитокинов.

Препараты рчИЛ-1 β и рчФНО α оказали наиболее выраженное стимулирующее действие и на процесс антителообразования. При введении рчИЛ-1 β и рчФНО α с вакциной в разведении 1:25 отмечено увеличение титров вируснейтрализующих АТ в 4,8 и 1,9 раза, в разведении 1:125 - в 2,6 и 1,7 раза, соответственно, по сравнению с контролем (Рисунок 3).

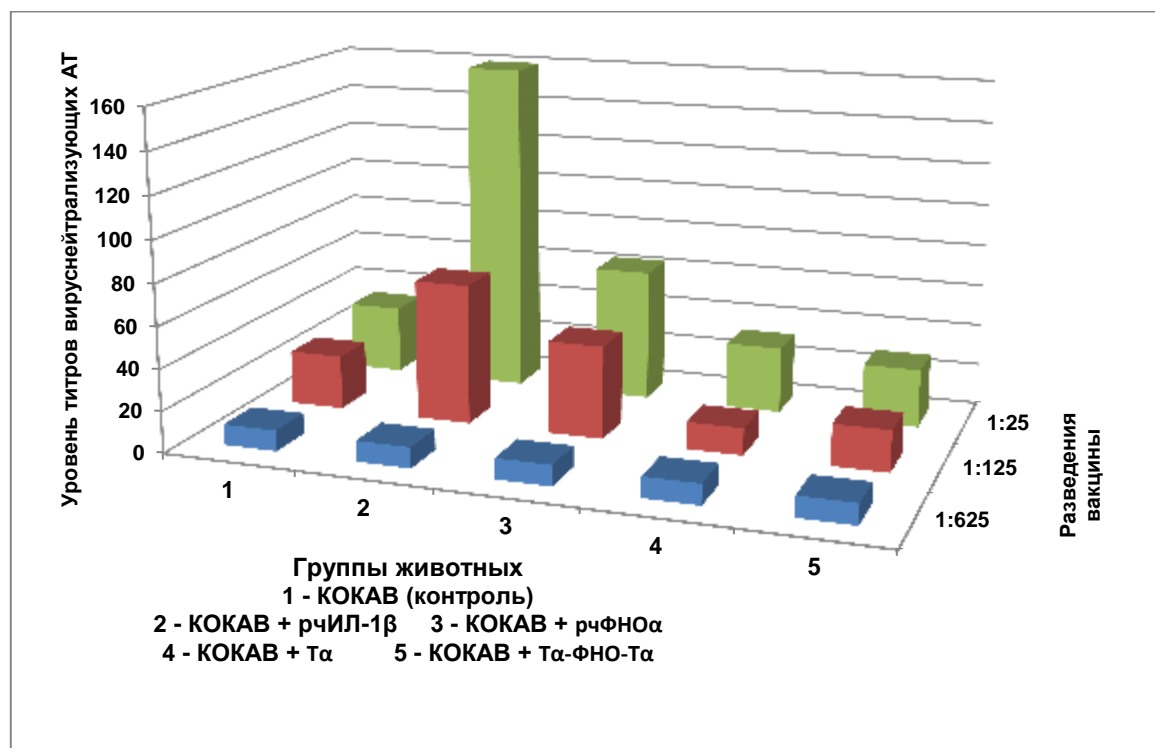


Рисунок 3 – Уровень титров АТ при иммунизации КОКАВ на фоне введения цитокинов

При оценке клеточного иммунитета установлено, что наиболее выраженный стимулирующий эффект на уровень спонтанной, митоген- и антиген-индуцированной пролиферации лимфоцитов оказал рчИЛ-1 β при сочетанном введении с КОКАВ ($p < 0,05$). Повышение спонтанного и митоген-индуцированного пролиферативного ответа лимфоцитов выявлено в группе мышей, иммунизированных КОКАВ на фоне введения рчТ α (Таблица 4).
Таблица 4 – Индекс стимуляции пролиферации лимфоцитов селезенки мышей, иммунизированных КОКАВ в сочетании с препаратами цитокинов (n=175)

Группы животных	Уровень пролиферации лимфоцитов (индекс стимуляции)			
	спонтанная	ФГА	КонА	КОКАВ
КОКАВ (контроль)	1,49 ± 0,14	1,21 ± 0,19	0,84 ± 0,21	1,29 ± 0,35
КОКАВ + рчИЛ-1 β	4,59 ± 1,31*	2,52 ± 0,40*	2,67 ± 0,41*	2,02 ± 0,31*
КОКАВ + рчФНО α	1,10 ± 0,08	1,48 ± 0,11	0,96 ± 0,22	0,80 ± 0,21
КОКАВ + рчТ α	2,01 ± 0,11*	1,83 ± 0,17*	1,68 ± 0,31*	1,37 ± 0,25
КОКАВ + Т α -ФНО-Т α	1,37 ± 0,10	1,41 ± 0,15	0,66 ± 0,21	1,07 ± 0,30

Примечание: * - $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе

Увеличение эффективности КОКАВ отмечено и при ее использовании в сочетании с комплексом цитокинов, включающим рЧИЛ-1 β , рЧИЛ-2 и рчФНО α . Животные, иммунизированные КОКАВ на фоне комплекса цитокинов, были в большей степени защищены при их последующем заражении фиксированным вирусом бешенства по сравнению с контрольной группой (Рисунок 4).

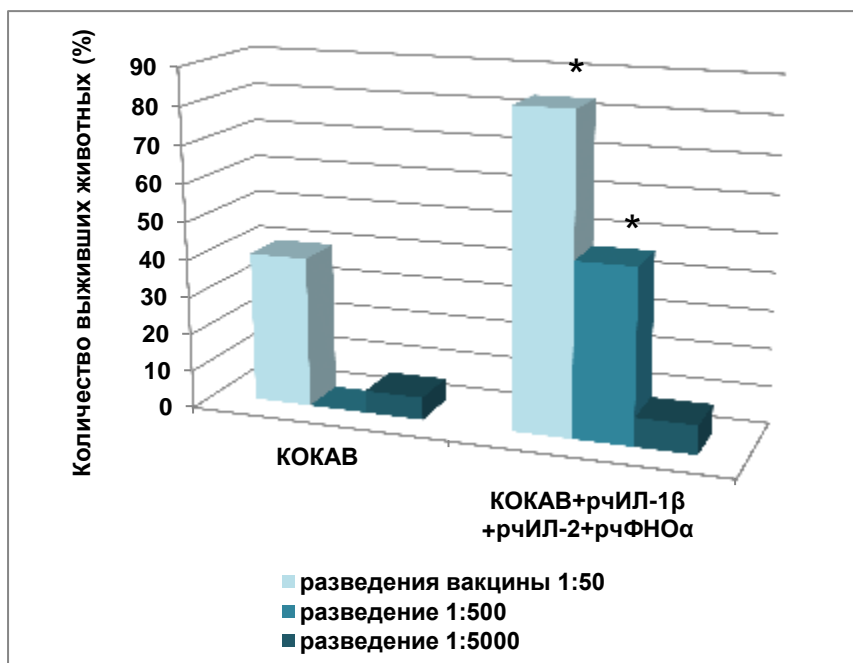


Рисунок 4 - Влияние комплекса цитокинов на протективный эффект КОКАВ
* - $p < 0,05$ по отношению к группе животных, иммунизированных КОКАВ

Как видно из рисунка 4, количество выживших животных в опытной группе, иммунизированной вакциной в разведении 1:50, в 2,0 раза превышало показатели контроля (83,4 % и 40,0 %, соответственно), а в разведении 1:500 – в опытной группе выжило 46,1% мышей, а в контрольной все животные погибли. Доза вакцины, обеспечивающая защиту 50% мышей при введении с комплексом цитокинов, в 7,3 раза меньше, чем доза вакцины без цитокинов (разведения 1:365 и 1:50, соответственно).

В группе животных, иммунизированных КОКАВ на фоне комплекса цитокинов, установлено повышение антигенспецифической пролиферации лимфоцитов по сравнению с контролем ($p < 0,05$), что свидетельствует о более выраженном развитии специфического иммунного ответа (Таблица 5).

Кроме того, в данной группе отмечено, по сравнению с контролем, увеличение процентного содержания Т-хелперов (с $24,3 \pm 2,4$ % до $76,0 \pm 4,0$ %) и снижение содержания Т-лимфоцитов с цитотоксической / супрессорной активностью (с $58,0 \pm 3,6$ % до $39,8 \pm 3,3$ %).

Таблица 5 - Уровень пролиферативного ответа лимфоцитов селезенки мышей на 7-е сут после иммунизации КОКАВ или КОКАВ в сочетании с комплексом цитокинов (n=178)

Группы животных	Уровень пролиферации лимфоцитов (имп/мин)		
	спонтанная	ФГА-индуцированная	КОКАВ (АГ-специфическая)
Интактные мыши (контроль)	3400,7±939,4	7773,5±918,5	2358,0±737,3
Комплекс цитокинов рчИЛ-1β +рчИЛ-2 +рчФНОα	4572,4±477,5	8639,5±1628,4	4548,8±698,0
КОКАВ	5726,7±1830,9	11846,7±2152,5	10652,3±2544,6*
КОКАВ +рчИЛ-1β+рчИЛ-2+рчФНОα	8187,5±2541,6*	14347,6±2535,7*	17739,3±3563,7*

Примечание: * - p<0,05 по отношению к контролю

Таким образом, при профилактической иммунизации использование препаратов цитокинов в сочетании с вакциной способствовало повышению протективного эффекта КОКАВ. Наиболее выраженный адъювантный эффект наблюдался при использовании рчИЛ-1β и рчФНОα в виде монопрепаратов или комплекса цитокинов, включающего рчИЛ-1β, рчИЛ-2 и рчФНОα. При этом возрастало количество выживших животных (в 1,2 – 2 раза) и существенно снижалась (в 7,3 раза) величина предельного разведения вакцины, обеспечивающая 50 % выживаемость животных. Повышение протективного эффекта вакцины сопровождалось формированием вируснейтрализующих АТ в более высоких титрах и стимуляцией клеточного иммунного ответа.

Во второй серии исследований по изучению влияния адъювантов на иммуногенную активность антирабических вакцин использовали схему лечебной иммунизации экспериментальных животных. Вакцину КАВ и адъюванты вводили мышам после заражения фиксированным вирусом бешенства (штамм CVS). Схема иммунизации представлена на рисунке 5.



Рисунок 5 - Схема эксперимента при лечебной иммунизации против бешенства

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что введение КАВ с рчИЛ-1β или «Имунофаном» практически не оказало влияния на протективный эффект вакцины при всех используемых разведениях (1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512). Эффект

отмечен только в группе животных, иммунизированных КАВ (разведение 1:32) в сочетании с рчИЛ-1 β , при этом количество выживших животных составляло 82,5 \pm 6,0 % и достоверно ($p < 0,05$) отличалось от показателя контрольной группы (62,8 \pm 7,4 %), иммунизированной вакциной в указанном разведении. Одной из причин отсутствия усиления протективного эффекта может быть внутримозговой путь введения вируса бешенства (непосредственно в центральную нервную систему), использованный при данной схеме эксперимента, и подкожное введение вакцины и адъювантов.

2.2. Изучение адъювантных свойств цитокинов при иммунизации животных вакциной против клещевого энцефалита

Эффективность иммунизации мышей линии Balb/c вакциной против клещевого энцефалита в сочетании с цитокинами оценивали по количеству выживших животных; величине предельного разведения вакцины, обеспечивающей 50 % выживаемость животных при заражении вирусом клещевого энцефалита (ПР₅₀) и величине минимальной иммунизирующей дозы ВКЭ, защищающей 50 % животных (МИД₅₀) при заражении вирусом. При этом оценивали показатели гуморального и клеточного иммунитета экспериментальных животных. Схема эксперимента представлена на рисунке 6.



Рисунок 6 - Схема иммунизации вакциной ВКЭ

Установлено, что рчИЛ-1 β , рчФНО α , гибридный белок «Неотим» и «Имунофан» способствовали повышению иммуногенной активности ВКЭ. Величина ПР₅₀ в опытных группах превышала уровень контрольной группы, т.е. протективный эффект оказывала меньшая доза вакцины (Рисунок 7).

Отмечено повышение иммуногенности вакцины, вводимой в сочетании с цитокинами, на 28 % - 58 % в зависимости от препаратов, используемых для стимуляции иммунного ответа. Выявленные различия статистически достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Использование комплекса цитокинов, включающего рчИЛ-1 β , рчИЛ-2, рчФНО α и «Имунофан», повышало иммуногенность вакцины, но усиления иммунопотенцирующего действия, по сравнению с введением указанных цитокинов в виде монопрепаратов, не выявлено.

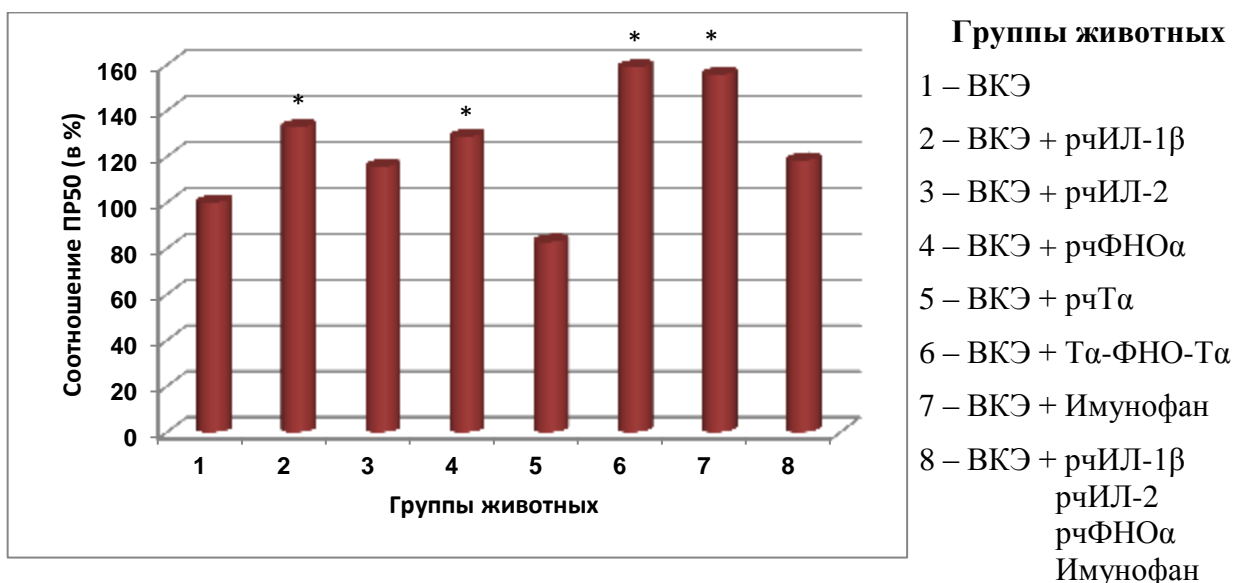


Рисунок 7 - Влияние цитокинов на протективный эффект ВКЭ

* - $p < 0,05$ по отношению к группе животных, иммунизированных ВКЭ

Повышение протективного эффекта вакцины на фоне введения цитокинов сопровождалось стимуляцией неспецифического и специфического клеточного иммунного ответа. При введении вакцины в сочетании с рЧИЛ-2, белком «Неотим» или «Имунофаном» наблюдалось статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение количества Т- и В-лимфоцитов селезенки по сравнению как с группой интактных мышей, так и с группой животных, получившей вакцину без цитокинов (Таблица 6).

Таблица 6 - Количественное содержание Т- и В-лимфоцитов в селезенке мышей линии Balb/c на 8-е сут после иммунизации (n=250)

Группы животных	Т-Лф (в %)	В-Лф (в %)
Интактные мыши	29,2 ± 3,0	41,1 ± 0,9
ВКЭ	26,2 ± 1,9	46,1 ± 1,5
ВКЭ + рЧИЛ-1β	40,6 ± 4,1 *	56,2 ± 4,6 *
ВКЭ + рЧИЛ-2	41,7 ± 2,2 *,**	54,1 ± 2,2 *,**
ВКЭ + рчФНОα	38,9 ± 2,2 *	56,4 ± 1,5 *,**
ВКЭ + рчТα	38,6 ± 1,5 *	52,6 ± 2,6 *
ВКЭ + Тα-ФНО-Тα	49,2 ± 1,5 *,**	60,7 ± 1,5 *,**
ВКЭ + Имунофан	42,7 ± 2,7 *,**	58,6 ± 2,1 *,**
ВКЭ + рЧИЛ-1β + рЧИЛ-2 + рчФНОα + Имунофан	38,6 ± 2,9 *	53,3 ± 3,9 *

Примечание: * - $p < 0,05$ по отношению к группе интактных мышей

** - $p < 0,05$ по отношению к группе мышей, иммунизированных ВКЭ

Оценку функциональной активности лимфоцитов селезенки проводили в реакции бласттрансформации. Все используемые цитокины оказали стимулирующий эффект на митоген- и антиген-индуцированную пролиферацию лимфоцитов. Наиболее выраженное повышение уровня антигенспецифической пролиферации лимфоцитов, по сравнению с контрольной группой, выявлено в группах мышей, иммунизированных ВКЭ в сочетании с

рЧИЛ-1β или рЧИЛ-2 (639,6±104,6 и 924,0±133,0 имп/мин, соответственно; 292,8±76,0 имп/мин – в контроле) (p<0,05).

Гемагглютинирующие АТ к вирусу клещевого энцефалита при исследовании сывороток мышей в РТГА не выявлены как в контрольной группе животных, иммунизированной ВКЭ, так и во всех опытных группах, иммунизированных вакциной в сочетании с цитокинами.

Таким образом, наиболее высокий уровень резистентности мышей к заражению вирулентным штаммом вируса клещевого энцефалита наблюдался при сочетанном использовании с вакциной рЧИЛ-1β, рЧИЛ-2, рЧФНОα, гибридного белка «Неотим» и препарата «Имунофан». Более выраженный протективный эффект при использовании ВКЭ с адьювантами сопровождался активацией специфического клеточного иммунитета.

2.3. Изучение адьювантных свойств цитокинов при иммунизации животных вакциной против гепатита А (Геп-А-ин-ВАК)

В исследованиях на морских свинках эффективность иммунизации вакциной Геп-А-ин-ВАК в сочетании с цитокинами (рЧИЛ-1β, рЧИЛ-2, рЧФНОα, тимозин альфа 1, гибридный белок «Неотим») и препаратом «Имунофан» оценивали по уровню титров специфических АТ и по числу сероположительных животных (титр АТ выше 1:10). Схема эксперимента представлена на рисунке 8.



Рисунок 8 - Схема иммунизации животных вакциной Геп-А-ин-ВАК

Выявлено стимулирующее действие исследованных препаратов на выработку АТ к ВГА как в 1-й, так и во 2-й срок обследования (Рисунок 9). На 1-ом сроке обследования титры АТ в группе с рЧФНОα - в 9,5 раза, рЧИЛ-1β - в 8,4 раза, рЧИЛ-2 и «Имунофаном» - в 2,7 раза превышали уровень контрольной группы (p<0,05).

Аналогичные результаты получены и на 2-ом сроке обследования. Титры АТ в группах животных, иммунизированных вакциной с рЧФНОα в 9,4 раза, рЧИЛ-1β - в 10 раз, «Имунофаном» - в 6,0 раз превышали показатель в контроле (p<0,05). Следует отметить, что при введении вакцины с рЧГа или Га-ФНО-Га также отмечено повышение уровня титров специфических АТ.

Частота сероположительных животных на 1 сроке обследования в группах при введении вакцины с рЧИЛ-1 β , рЧИЛ-2 или рчФНО α достигла 100% и достоверно ($p < 0,05$) отличалась от показателя в контроле (72,6 %).

После 3-кратного введения препаратов частота сероположительных животных в контрольной группе составила 74,5 %, а во всех группах животных, иммунизированных вакциной с цитокинами, достигла 100 %.

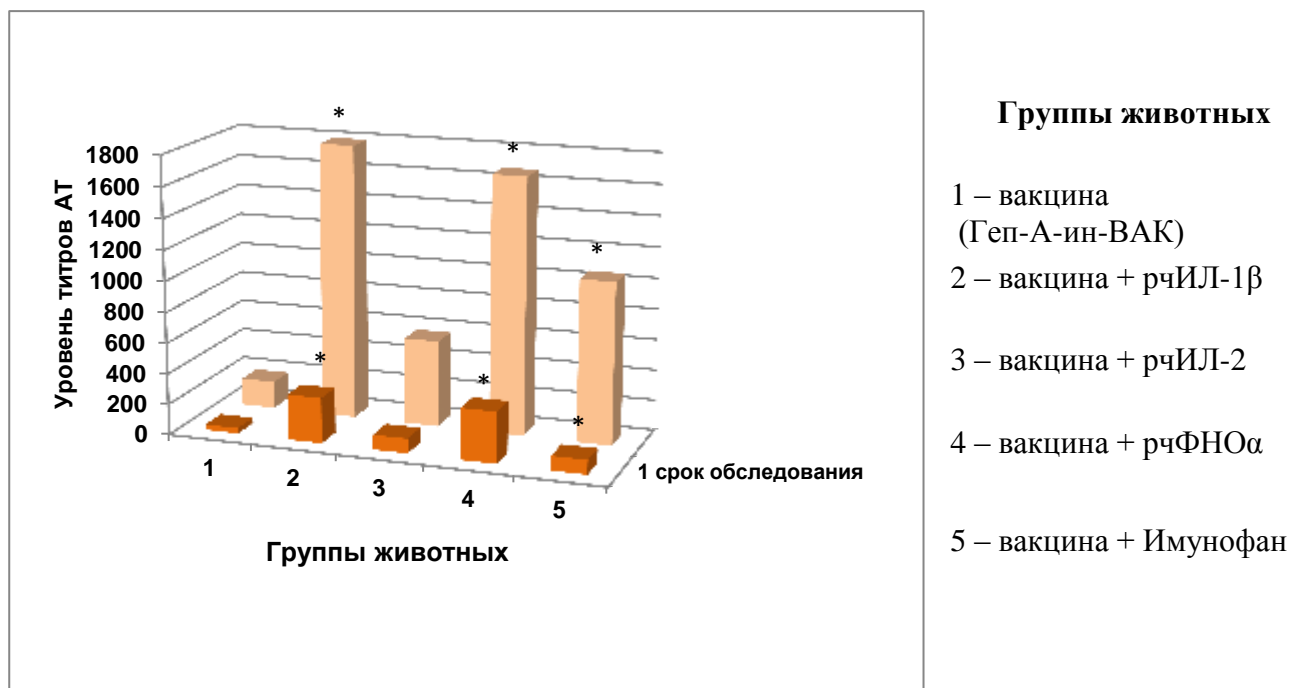


Рисунок 9 - Уровень титров АТ к ВГА при иммунизации Геп-А-ин-ВАК на фоне цитокинов

* - $p < 0,05$ по отношению к группе животных, иммунизированных Геп-А-ин-ВАК

Таким образом, препараты цитокинов и препарат «Имунофан» повышали иммуногенную активность вакцины против гепатита А. Сочетанное введение цитокинов с вакциной Геп-А-ин-ВАК способствовало формированию АТ к ВГА в более высоких титрах (в 2,7 - 10 раз) и обеспечивало 100 % сероконверсию животных после введения препаратов.

Во второй серии экспериментов изучено влияние рчФНО α на иммуногенность конъюгированной вакцины против гепатита А. Эффективность иммунизации оценивали по величине иммунизирующей дозы вакцины (ИД₅₀) и уровню титров специфических АТ. Изучение адьювантного эффекта рчФНО α в данной модельной системе проводили при его сочетанном введении как с полуфабрикатом конъюгированной вакцины (без добавления лекарственной формы ПО), так и с вакциной при добавлении ПО.

В группе животных, иммунизированных полуфабрикатом вакцины в сочетании с рчФНО α (доза 100 Ед/мышь), выявлено снижение ИД₅₀ на 45 % и стимуляция выработки АТ к АГ ВГА, по сравнению с животными, иммунизированными только полуфабрикатом вакцины. При введении полуфабриката вакцины в дозе 12,5 нг АГ ВГА с рчФНО α , в 40 % случаев выявлялись АТ в титре 1:160 и выше, в дозах 6,25 и 1,56 нг АГ ВГА – в 40-60 % случаев выявлялись АТ в титре 1:40, тогда как в контрольной группе титр выявляемых АТ составлял 1:10.

При введении вакцины с ПО и рчФНО α наиболее выраженный стимулирующий эффект рчФНО α выявлен при его сочетанном использовании с ПО в дозе 40 мкг/мышь (Рисунок 10).

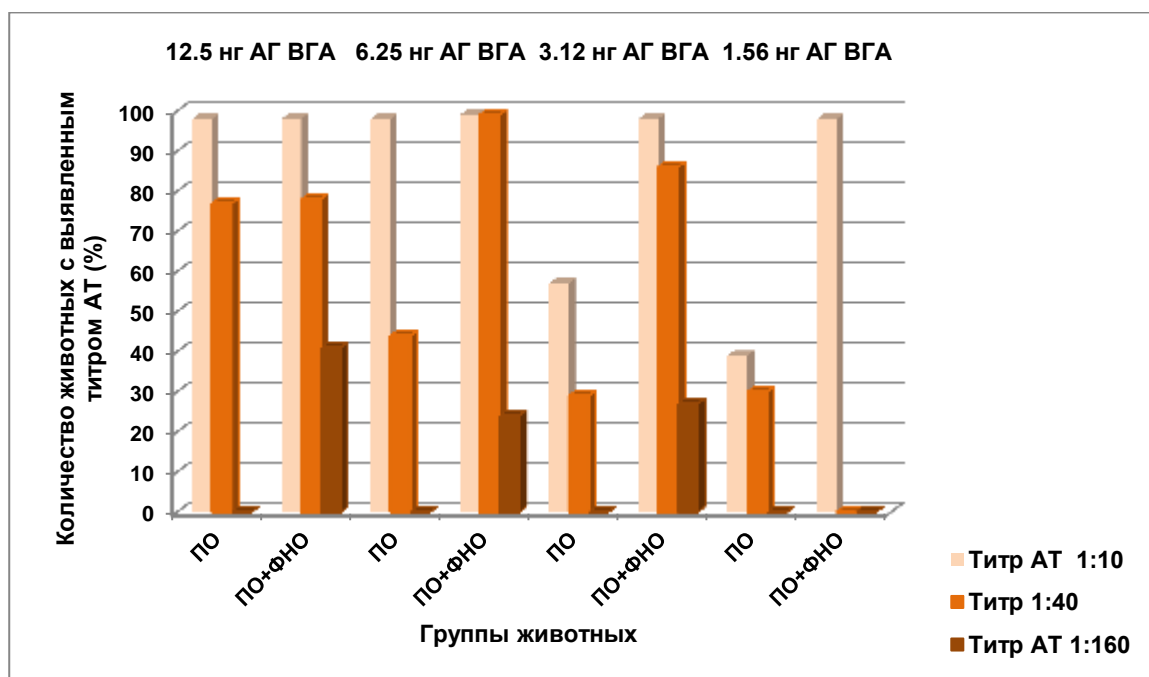


Рисунок 10 - Уровень титров АТ к ВГА при сочетанном введении вакцины с ПО или с рчФНО α и ПО (доза 40 мкг/мышь)

Как видно из рисунка, в группах животных, иммунизированных вакциной в дозах 12,5, 6,25, 3,12 и 1,56 нг АГ ВГА в сочетании с рчФНО α , АТ в титре 1:160 и выше выявлялись в 25-40 % случаев. При иммунизации животных конъюгированной вакциной в сочетании с ПО максимальный титр выявляемых АТ составлял 1:40.

Таким образом, рчФНО α оказывает стимулирующее влияние на иммуногенность конъюгированной вакцины против гепатита А, индуцируя синтез АТ к АГ ВГА.

2.4. Изучение адъювантных свойств цитокинов при иммунизации животных вакциной против гепатита В

Исследования на животных без иммуносупрессии

В предварительных исследованиях были подобраны дозы вакцины, вызывающие невысокий уровень иммунного ответа, что позволяло оценить адъювантный эффект препаратов цитокинов, а также выбраны схемы введения вакцины и адъювантов.

При **однократной** иммунизации животных вакциной в дозах от 0,83 до 0,01 мкг/мышь в сочетании с рчИЛ-1 β или рчИЛ-2 установлено, что меньшие дозы вакцины (0,09 и 0,27 мкг/мышь), вводимые на фоне цитокинов, вызывали развитие иммунного ответа, выраженность которого сопоставима с ответом на большую дозу вакцины (0,83 мкг/мышь), вводимую без цитокинов. При иммунизации вакциной в дозах 0,09 и 0,27 мкг/мышь в сочетании с цитокинами уровень сероконверсии составил 40 - 60 %. Аналогичный показатель сероконверсии (40 %) отмечен в группе, иммунизированной одной вакциной в дозе 0,83 мкг/мышь (Рисунок 11).

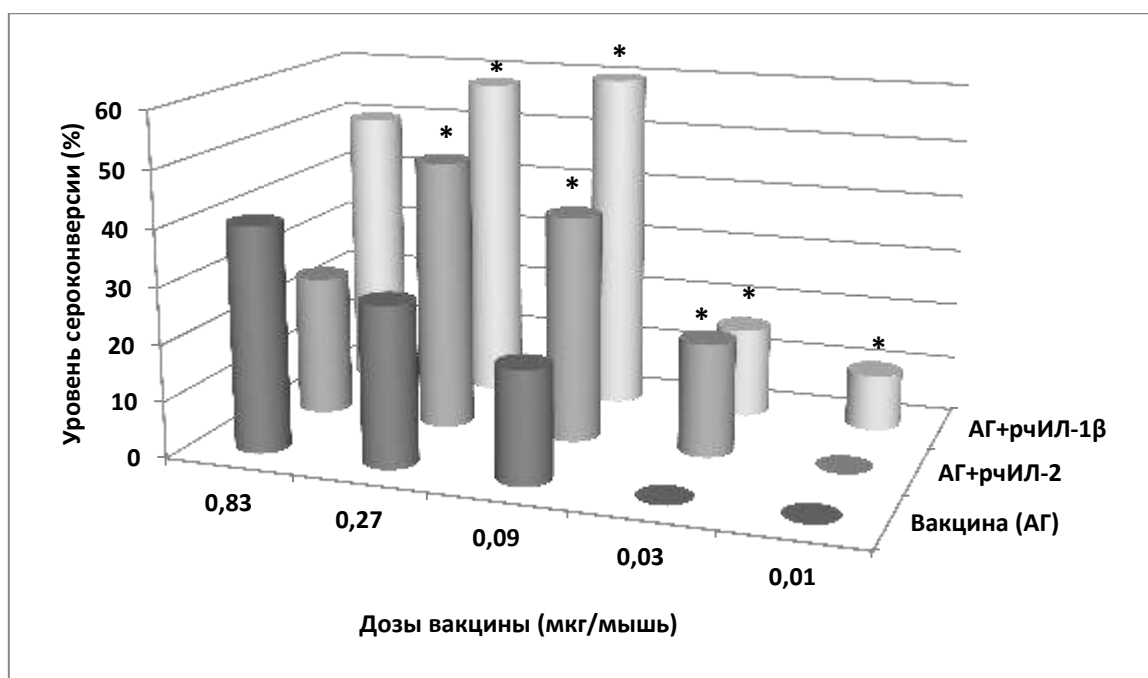


Рисунок 11 - Уровень сероконверсии на 15 сут после иммунизации в сочетании с препаратами цитокинов
* - $p < 0,05$ по отношению к контролю (вакцина)

Как видно из рисунка, введение вакцины в минимальных дозах (0,01 и 0,03 мкг/мышь) без цитокинов не сопровождалось развитием иммунного ответа (формированием специфических АТ). Указанные дозы вакцины только в сочетании с препаратами цитокинов приобретали способность проявлять иммунизирующий эффект.

Иммуностимулирующий эффект цитокинов оценивали и после *двукратной* иммунизации животных, дизайн представлен на рисунке 12.

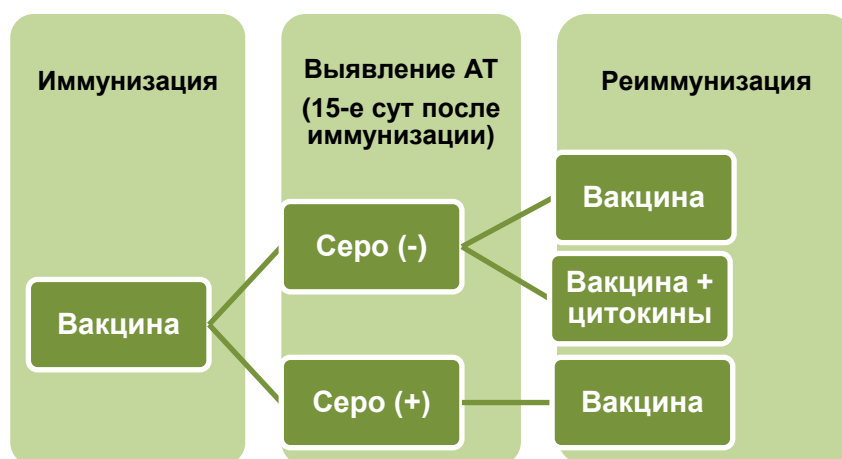


Рисунок 12 - Дизайн экспериментов с введением цитокинов на этапе реиммунизации животных

Цитокины с вакциной вводили только тем животным, которые на 15 сут после иммунизации вакциной (перед реиммунизацией) оставались серонегативными. Животных контрольной группы реиммунизировали одной вакциной.

В группах животных, реиммунизированных вакциной в сочетании с цитокинами, на 30 сут эксперимента количество сероположительных животных значительно возросло по сравнению с контролем (Таблица 7).

Таблица 7 - Влияние препаратов рЧИЛ-1β и рЧИЛ-2 на иммуногенность вакцины против гепатита В при реиммунизации животных, серонегативных на 15 сут эксперимента (n=135)

Реиммунизация (группы животных)	Количество сероположительных животных (в %) на 30 сут эксперимента	
	доза вакцины	
	0,27 мкг/мышь	0,09 мкг/мышь
Вакцина (контроль)	42,8 ± 3,6	20,0 ± 5,2
Вакцина + рЧИЛ-1β	100 *	90,9 ± 4,1**
Вакцина + рЧИЛ-2	75,0 ± 3,9*	69,2 ± 6,5**

Примечание: *,** - $p < 0,05$ по отношению к контрольным группам

Как видно из таблицы 7, уровень сероконверсии превышал показатели контроля в группах животных, реиммунизированных вакциной в сочетании с препаратом рЧИЛ-1β, в 2,3 и 4,5 раза, а с препаратом рЧИЛ-2 – в 1,7 и 3,4 раза. Более выраженный уровень стимуляции отмечен при введении вакцины в сочетании с рЧИЛ-1β (уровень сероконверсии в опытных группах составил 100 % и 90,9 %, а в контрольной – 42,8 % и 20 %, соответственно дозам вакцины).

Изучение стимулирующего эффекта цитокинов на интенсивность иммунного ответа на вакцину проводили как при однократном введении цитокинов (на этапе иммунизации или реиммунизации), так и при двукратном (на этапах иммунизации и реиммунизации). Дизайн представлен на рисунке 13.

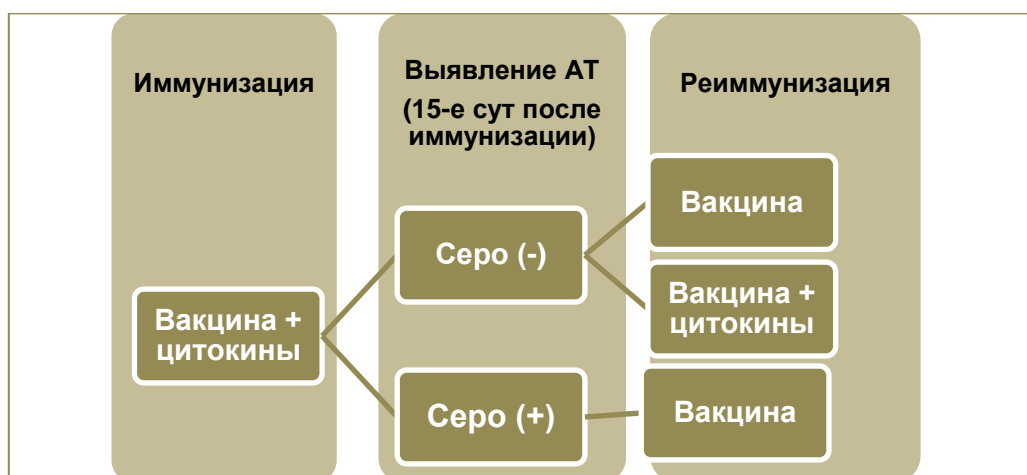


Рисунок 13 - Дизайн экспериментов с введением цитокинов при иммунизации и реиммунизации животных

При использовании двукратной схемы иммунизации (доза вакцины 0,27 мкг/мышь) проведена оценка иммуноадьювантного действия комплекса препаратов цитокинов, включающего рЧИЛ-1β и рЧИЛ-2, а также препаратов «Аффинолейкин» и «Имунофан» (Рисунок 14).

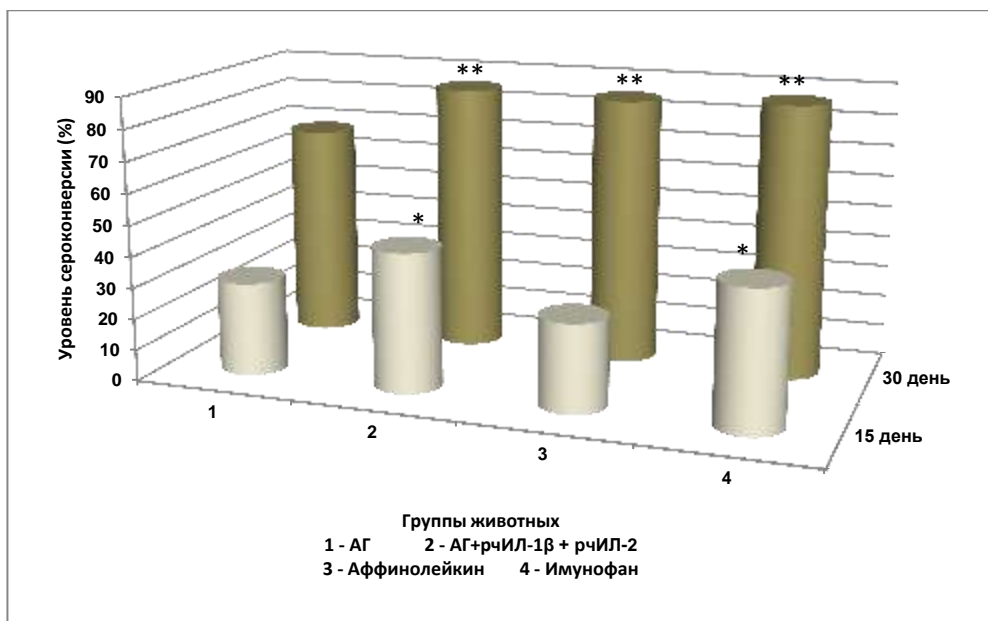


Рисунок 14 - Уровень сероконверсии на 15 и 30 сут эксперимента после иммунизации вакциной в сочетании с цитокинами
*,** - $p < 0,05$ по отношению к контролю на 15 и 30 сут эксперимента

Установлено, что введение комплекса так же эффективно, как и индивидуальное введение препаратов цитокинов. Адьювантный эффект комплекса цитокинов и препарата «Имунофан» наблюдался как на 15, так и на 30 сут эксперимента. Стимулирующее действие препарата «Аффинолейкин» отмечено только на 30 сут эксперимента, после повторного введения с вакциной.

Таким образом, в экспериментах на животных без иммуносупрессии выявлено стимулирующее влияние цитокинов после однократной иммунизации вакциной против гепатита В, а также после реиммунизации животных, которые оставались серонегативными к 15 сут после иммунизации, по сравнению с животными, иммунизированными вакциной.

Исследования на животных с индуцированной иммуносупрессией

Введение животным ЦФ приводило к развитию иммуносупрессии, о чем свидетельствовало снижение уровня нейтрофилов и лейкоцитов, а также более низкий уровень интенсивности иммунного ответа на вакцину у иммунодефицитных животных.

При иммунизации животных вакциной в дозах 0,83 и 0,27 мкг/мышь без цитокинов уровень сероконверсии на 15 сут эксперимента в группе иммунодефицитных животных был в 1,8 и 1,6 раза ниже по сравнению с животными без иммуносупрессии (контроль). Так, в опытной группе количество сероположительных животных составляло 26,1±5,7 % и 25,3±5,6 % в контрольной – 48,5±6,5 % и 40,1±6,3 % соответственно дозам вакцины ($p < 0,05$).

Установлено, что уровень ответа иммунодефицитных животных сопоставим с уровнем ответа животных без иммуносупрессии только при условии их **реиммунизации** вакциной в сочетании с цитокинами. При реиммунизации указанных животных вакциной (дозы 0,83 и 0,27 мкг/мышь) без цитокинов, на 30 сут эксперимента сероконверсия отмечена в 55,5±6,4 % и 50,0±6,5 % случаев; а вакциной в сочетании с препаратом rИЛ-1β – в 87,5±4,3 % и 62,5±6,3 % случаев, соответственно. В группах животных без иммуносупрессии

при реиммунизации одной вакциной сероконверсия отмечена в $68,6 \pm 7,9$ % и $70,0 \pm 7,8$ % случаев, соответственно вышеуказанным дозам, а в сочетании с рЧИЛ-1 β достигла 100 %.

Стимулирующее действие препаратов цитокинов рЧИЛ-1 β и рЧИЛ-2 отмечено при их введении иммунодефицитным животным как на этапе иммунизации, так и реиммунизации, при этом наблюдалось формирование более выраженного иммунного ответа. На 15 сут после первичной иммунизации в группах, иммунизированных вакциной в сочетании с рЧИЛ-1 β , количество сероположительных животных превышало в 1,6 и 1,3 раза ($42,3 \pm 6,4$ % и $35,1 \pm 6,2$ %), в сочетании с рЧИЛ-2 - в 1,5 и 1,2 раза ($39,2 \pm 6,3$ % и $30,6 \pm 5,9$ %) показатели контрольной группы ($26,1 \pm 5,7$ % и $25,3 \pm 5,6$ %, соответственно).

После двукратной иммунизации (на 30 сут эксперимента) в группах животных, реиммунизированных вакциной в тех же дозах в сочетании с рЧИЛ-1 β , сероконверсия отмечена в 100 % случаев, с рЧИЛ-2 – в $85,7 \pm 4,5$ % и 100 % случаев. В контрольной группе (реиммунизированной одной вакциной) уровень сероконверсии составил $66,6 \pm 6,1$ % и $80 \pm 5,2$ %, соответственно дозам вакцины (0,83 и 0,27 мкг/мышь).

Таким образом, при иммунизации животных без иммуносупрессии введение препаратов цитокинов индуцировало развитие иммунного ответа на минимальные дозы вакцины против гепатита В, которые не обладали иммуногенным эффектом. Сочетанное введение вакцины с цитокинами иммунодефицитным животным стимулировало иммунный ответ, характеризующийся высоким уровнем сероконверсии, сопоставимым с уровнем ответа животных без иммуносупрессии. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о возможности преодоления специфической неответчивости путем использования адъювантов при иммунизации вакциной против гепатита В.

В целом результаты экспериментальных исследований позволяют заключить, что используемые препараты цитокинов являются эффективными иммуноадъювантами, усиливающими специфический иммунный ответ на противовирусные вакцины. Адъювантное действие цитокинов на иммуногенность вакцин является неспецифическим. Эффект цитокинов может быть опосредован их стимулирующим влиянием на экспрессию молекул адгезии, синтез хемокинов, миграцию иммунокомпетентных клеток, экспрессию АГ ГКГ на АПК, презентацию АГ, пролиферацию, дифференцировку и активацию различных типов клеток, что способствует индукции более выраженного иммунного ответа на АГ вакцинного препарата.

Способность цитокинов оказывать влияние на рост и дифференцировку эффекторных клеток, а также на сохранение повышенной эффекторной активности дифференцированных клеток при развитии вторичного иммунного ответа также является одним из механизмов, лежащих в основе их адъювантного действия, что обеспечивает более выраженную иммуногенность вакцин.

Основными показателями качества профилактических вакцин являются их эффективность и безопасность. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что сочетанное введение цитокинов в качестве адъювантов с противовирусными вакцинами повышало иммуногенность вакцин, но не влияло на их безопасность, не отмечено случаев гибели и снижения массы тела экспериментальных животных.

В таблице 8 представлены общая схема изучения иммуноадъювантного действия цитокинов и обобщенные результаты исследований.

Таблица 8 - Общая схема экспериментального изучения адьювантного действия цитокинов и обобщенные результаты исследований

Противовирусные вакцины			
Антирабические вакцины (КОКАВ, КАВ)	Вакцина против клещевого энцефалита (ВКЭ)	Вакцина против гепатита А (Геп-А-ин-ВАК / конъюгат Геп-А-ин-ВАК с ПО)	Вакцина против гепатита В (Engerix B)
1	2	3	4
Препараты цитокинов / дозы			
<i>Монопрепараты</i> рчИЛ-1β - 100 нг рчИЛ-2 - 100 МЕ рчФНОα - 100 нг рчТα - 1,0 мкг «Неотим» - 1,0 мкг <i>Комплекс цитокинов</i> рчИЛ-1β - 10 нг рчИЛ-2 - 10 МЕ рчФНОα - 10 нг	<i>Монопрепараты</i> рчИЛ-1β - 10 нг рчИЛ-2 - 100 МЕ рчФНОα - 10 Ед рчТα - 1,0 мкг «Неотим» - 1,0 мкг	<i>Монопрепараты</i> На морскую свинку рчИЛ-1β - 1,0 мкг рчИЛ-2 - 10000 МЕ рчФНОα - 1000 Ед рчТα - 1,0 мкг «Неотим» - 1,0 мкг На мышшь рчФНОα - 100 Ед	<i>Монопрепараты</i> рчИЛ-1β - 10 нг рчИЛ-2 - 100 МЕ «Аффинолейкин» (фактор переноса) - 1 ед <i>Комплекс цитокинов</i> рчИЛ-1β - 5 нг рчИЛ-2 - 50 МЕ
Иммуностимуляторы / дозы			
Имунофан - 0,05 мкг	Имунофан - 0,05 мкг	На морскую свинку - Имунофан - 1,5 мкг На дозу - ПО - 1000, 200 и 40 мкг	Имунофан - 0,05 мкг
Иммунизация			Иммунизация/реиммунизация
I-профилактическая: КОКАВ , 1:25, 1:125, 1:625 и 1:50, 1:500, 1:5000, в/бр, 0,5 мл, 2-кратно, через неделю Цитокины: в/бр, 0,5 мл, одновременно Заражение: на 8 сут, интрацеребрально, доза вируса 3,0-3,6 Ig LD ₅₀ /0,03 мл II – лечебная Заражение: сразу интрацеребрально, доза вируса 0,6-0,9 Ig LD ₅₀ /0,03 мл. КАВ , 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512; п/к, 0,1 мл, в течение 5 сут после заражения; рчИЛ-1β-200 нг/мышшь, Имунофан-50 нг/мышшь, п/к, одновременно	ВКЭ, разведения 1:10, 1:32, 1:100, 1:320, п/к, 0,5 мл, 3-кратно с интервалом в одни сутки, мышши линии Valb/c Цитокины: п/к, 0,5 мл, одновременно Заражение: вирус клещевого энцефалита (тест штамм «Абсеттаров») в титре 8,5-9,2 Ig LD ₅₀ /0,25 мл, в/бр, на 9 сут после окончания введения препаратов	Морским свинкам – Геп-А-ин-ВАК, дозы 60-70 и 120 ЕД активности АГ ВГА, 3-кратно 0,5 мл с интервалом в две недели, в/м и п/к, Цитокины: п/к, 0,5 мл, одновременно Конъюгированная вакцина (25 мг АГ ВГА и 2,5 мкг ПО), разв.1:2, 1:4, 1:8, 1:16) в/бр, 0,5 мл, однократно, б/п мышши Полуфабрикат вакцины (без добавления лекарственной формы ПО), те же разведения Цитокины: п/к, 0,5 мл, одновременно	Нормальные и иммунодефицитные животные Дозы вакцины - 0,83, 0,27, 0,09, 0,03, 0,01 мкг/мышшь, в/бр, 0,5 мл, однократно или двукратно с интервалом в две недели, мышши линии Valb/c Цитокины: п/к, 0,5 мл, одновременно, на этапах - иммунизации - реиммунизации - иммунизации и реиммунизации Двукратно цитокины вводили животным, которые к 15 сут оставались серонегативными

Оценка показателей			
Гуморальный, клеточный, протективный иммунитет	Гуморальный, клеточный, протективный иммунитет	Гуморальный иммунитет	Гуморальный иммунитет
<p>Гуморальный иммунитет – 7-е сут после введения препаратов: - вируснейтрализующие АТ</p> <p>Клеточный иммунитет – 7-е сут после введения препаратов: - CD4⁺T- и CD8⁺T-Лф в селезенке - уровень экспрессии АГ ГКГ класса II на иммунокомпетентных клетках - функциональная активность Лф в РБТЛ</p> <p>Протективный иммунитет – 14 сут после заражения: - процент выживших животных - величина предельно допустимого разведения вакцины, обеспечивающего 50 % выживаемость животных после заражения</p>	<p>Гуморальный иммунитет – 8-е сут после введения препаратов: - гемагглютинирующие АТ</p> <p>Клеточный иммунитет – 8-е сут после введения препаратов: - содержание Т-Лф и В-Лф в селезенке - функциональная активность Лф в РБТЛ</p> <p>Протективный иммунитет – 14 сут после заражения - процент выживших животных - величина предельно допустимого разведения вакцины, обеспечивающего 50 % выживаемость животных после заражения</p>	<p>Гуморальный иммунитет 1 срок обследования - 14-е сут после 2-го введения препаратов 2 срок обследования - 14 сут после 3-го введения препаратов</p> <p>- титр АТ к ВГА в сыворотке крови морских свинок - количество сероположительных животных</p>	<p>Гуморальный иммунитет на 15-е и 30-е сут эксперимента (после иммунизации и реиммунизации) - количество сероположительных животных</p>
		<p>28-е сут после иммунизации</p> <p>- величина иммунизирующей дозы вакцины (ИД₅₀), - уровень титров специфических АТ</p>	

Эффект адъювантов (стимуляция иммунного ответа)			
<p>Повышение титра вируснейтрализующих АТ</p> <p>Увеличение процентного содержания CD4⁺T-Лф</p> <p>Повышение числа клеток, экспрессирующих АГ ГКГ</p> <p>Стимуляция спонтанной, митоген- и антиген-индуцированной пролиферации Лф</p> <p>Повышение выживаемости животных</p> <p>Снижение дозы вакцины, обеспечивающей 50 % защиту животных при заражении вирусом бешенства</p>	<p>Гемагглютинирующие АТ не выявлены</p> <p>Увеличение процентного содержания Т- и В-Лф</p> <p>Стимуляция митоген- и АГ-индуцированной пролиферации Лф</p> <p>Повышение выживаемости животных</p> <p>Снижение дозы вакцины, обеспечивающей 50 % защиту животных при заражении вирусом клещевого энцефалита</p>	<p>Повышение титров АТ к ВГА</p> <p>100 % сероконверсия в группах животных, иммунизированных на фоне цитокинов</p> <p>Снижение 50 % иммунизирующей дозы конъюгированной вакцины</p> <p>При введении конъюгированной вакцины и полуфабриката вакцины с рчФНОα отмечено повышение частоты выявления специфических АТ и увеличение их титра</p>	<p>Стимуляция иммунного ответа у нормальных животных:</p> <p>- проявление иммунизирующего эффекта малыми дозами вакцины, не индуцирующими развитие иммунного ответа без цитокинов;</p> <p>- уровень иммунного ответа на меньшую дозу вакцины при введении с цитокинами сопоставим с ответом на более высокую дозу вакцины, введенную без цитокинов.</p> <p>Стимуляция иммунного ответа у животных с иммуносупрессией:</p> <p>- уровень иммунного ответа иммунодефицитных животных сопоставим с уровнем ответа нормальных животных при условии их иммунизации в сочетании с цитокинами</p>
Препараты, проявившие наиболее выраженный адъювантный эффект			
<p>Монопрепараты рчИЛ-1β, рчФНОα</p> <p>Комплекс (рчИЛ-1β + рчИЛ-2 + рчФНОα)</p>	<p>Монопрепараты рчИЛ-1β, рчФНОα, белок «Неотим», «Имунофан»</p>	<p>Монопрепараты рчИЛ-1 β, рчФНОα, тимозин α1, белок «Неотим», «Имунофан»</p>	<p>Монопрепараты рчИЛ-1β</p> <p>Комплекс (рчИЛ-1β + рчИЛ-2)</p>

В основе исследований по изучению цитокинов в качестве адъювантов противовирусных вакцин лежат наши исследования по оценке возможности преодоления иммунологической неответственности на АГ с помощью известного иммуномодулятора на модели формирования иммунного ответа в условиях *in vitro*. Указанная модель позволяет оценивать иммунный ответ в фазе индукции и на эффекторной стадии, а также выделять различные популяции иммунокомпетентных клеток (антиген-презентирующие и клетки-эффекторы / сенсibilизированные лимфоциты), оценивать их функциональную активность в зависимости от уровня экспрессии соответствующих маркеров. Исследования проведены на клетках мышей слабо отвечающей линии, в качестве адъюванта использован ПО.

2.5. Изучение возможности преодоления иммунологической неответственности мышей линии СВА, слабо отвечающих на синтетический полипептид (Т,Г)-А-Л, с помощью адъюванта

Исследования проводили на экспериментальной модели получения в условиях *in vitro* клеток-эффекторов ГЗТ, продуцирующих МИФ. При совместном культивировании лимфоцитов селезенки интактных мышей на монослое макрофагов, предварительно обработанных оптимальными дозами АГ, происходит формирование клеток-эффекторов ГЗТ, обладающих специфической активностью и способностью вырабатывать МИФ. Сенсibilизированные *in vitro* клетки-эффекторы ГЗТ оценивали на присутствие МИФ-продуцентов в реакции торможения миграции макрофагов.

Эксперименты проводили на клетках мышей линии СВА, которые являются слабо отвечающими на (Т,Г)-А-Л, и мышей линии С57В1/6, характеризующихся высоким уровнем иммунного ответа на указанный полипептид.

При использовании клеток мышей линии С57В1/6 при стимуляции чистым (Т,Г)-А-Л выявлено созревание эффекторных клеток, образующих МИФ (процент миграции составлял $63,1 \pm 7,3$). При предварительной обработке макрофагов селезенки мышей линии С57В1/6 МкАТ, направленными к IА^b-субрайону, отмечено подавление образования МИФ-продуцентов при стимуляции чистым (Т,Г)-А-Л (процент миграции составлял $93,1 \pm 7,7$).

На клетках мышей линии СВА при использовании в качестве АГ чистого (Т,Г)-А-Л образования МИФ-продуцентов не наблюдалось (процент миграции составлял $115,1 \pm 10,2$, при норме – от 80 до 120 %). Индукция созревания МИФ-продуцентов на клетках мышей указанной линии выявлена при использовании конъюгата (Т,Г)-А-Л с ПО. Выраженная реакция торможения миграции макрофагов отмечена, если конъюгат использовали при индукции и тестировании МИФ-продуцентов (процент миграции составлял $63,2 \pm 4,8$). Простая смесь (Т,Г)-А-Л + ПО, как и ПО не индуцировали образование МИФ-продуцентов.

Таким образом, полипептид (Т,Г)-А-Л при конъюгировании с полиэлектролитом ПО приобретает способность вызывать формирование МИФ-продуцентов в условиях *in vitro* при использовании клеток мышей линии СВА, слабо отвечающих на чистый (Т,Г)-А-Л.

2.6. Изучение влияния уровня экспрессии АГ ГКГ класса II на выраженность специфического иммунного ответа

Исследования по изучению зависимости интенсивности иммунного ответа от уровня экспрессии АГ ГКГ класса II на АПК проводили на моделях *in vitro* и *in vivo*.

При изучении формирования МИФ-продуцентов на (Т,Г)-А-Л показано, что обработка АПК МкАТ к АГ ГКГ класса II на стадиях индукции иммунного ответа и

проявления эффекторной функции способствовала снижению продукции МИФ. Это свидетельствует о том, что в процессах индукции МИФ-продуцентов и секреции фактора сенсibilизированными лимфоцитами принимают участие АГ ГКГ класса II.

Показано, что уровень пролиферативного ответа Т-лимфоцитов зависит от уровня экспрессии АГ ГКГ класса II на АПК. Предварительная обработка макрофагов не иммунизированных мышей линии Balb/c анти-IA^d- и анти-IE^d-МкАТ приводила к снижению уровня пролиферации Т-клеток на OVA на 35,1±3,9% и 49,3±3,5%, соответственно.

Степень зависимости уровня пролиферации Т-лимфоцитов на OVA от уровня экспрессии АГ класса II на поверхности АПК показана и при использовании в качестве АПК лимфоидной неоплазмы мышей линии P388D1. Известно, что клетки указанной линии не экспрессируют АГ ГКГ класса II и не участвуют в представлении АГ Т-клеткам. После стимуляции ИФγ клетки линии P388D1 становились Ia-положительными и это обуславливало проявление их антиген-презентирующей функции на эффекторной стадии развития пролиферации Т-клеток на OVA (Рисунок 15).

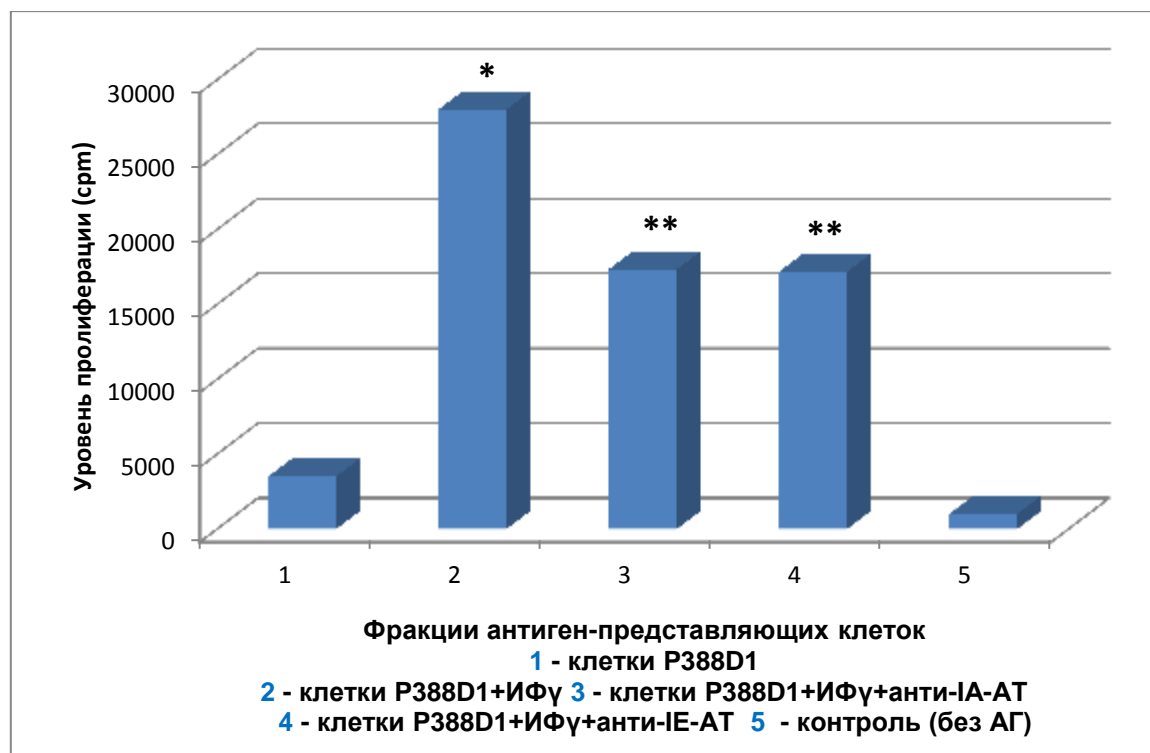


Рисунок 15 - Уровень пролиферации Т-клеток в зависимости от экспрессии АГ ГКГ класса II на АПК (клетки линии P388D1)

* - $p < 0,01$ по отношению к группе 1 ** - $p < 0,01$ по отношению к группе 2

Как видно из рисунка 15, при использовании в качестве АПК клеток линии P388D1, стимулированных ИФγ, отмечено повышение уровня пролиферации Т-клеток на OVA почти в 7 раз. Обработка стимулированных клеток МкАТ, направленными к IA^d- и IE^d-субрайонам, приводила к снижению уровня пролиферативного ответа Т-клеток на 34,51±3,1 % и 39,5±2,7 %, соответственно.

Следующим этапом работы было изучение роли АГ ГКГ класса II в стимуляции иммунного ответа на модели *in vivo* при оценке адьювантного действия комплекса цитокинов (рчИЛ-1 β , рчИЛ-2, рчФНО α), на иммуногенность вакцины против бешенства.

При оценке уровня экспрессии АГ класса II на клетках мышей линии СВА установлено, что количество Ia-положительных клеток в популяции лимфоцитов селезенки составляло от 10 до 14 %, а в популяции макрофагов – от 36 % до 47 %. При введении мышам комплекса цитокинов, вакцины КОКАВ или вакцины в сочетании с комплексом цитокинов отмечено повышение количества Ia-положительных клеток по сравнению с контрольной группой интактных животных. Наиболее выраженное стимулирующее действие на содержание клеток, экспрессирующих IA-АГ, отмечено и в группе животных, которым вводили вакцину в сочетании с комплексом цитокинов. Индекс повышения числа IA-положительных лимфоцитов и макрофагов составил $1,55 \pm 0,21$ и $1,57 \pm 0,18$, соответственно, по сравнению с группой животных, иммунизированных одной вакциной ($p < 0,05$). Следует отметить, что повышение числа клеток, экспрессирующих АГ класса II, наблюдалось и в группе, которой был введен только комплекс цитокинов.

При изучении функциональной активности лимфоцитов селезенки мышей установлено, что иммунизация КОКАВ на фоне комплекса цитокинов приводила к выраженному повышению уровня спонтанной, митоген-индуцированной и антигенспецифической пролиферации по сравнению с контрольной группой интактных животных (Таблица 5). Повышение антигенспецифической пролиферации лимфоцитов животных, иммунизированных КОКАВ, свидетельствует о стимуляции клеточного иммунного ответа.

Таким образом, изменение уровня экспрессии АГ ГКГ класса II на поверхности АПК приводило к изменению степени выраженности специфического иммунного ответа на ОВА и полипептид (Т,Г)-А-Л, что показано в реакциях пролиферации Т-клеток и созревания эффекторов ГЗТ в условиях *in vitro*. Сочетанное введение КОКАВ с комплексом цитокинов (рчИЛ-1 β , рчИЛ-2 и рчФНО α), способствовало как увеличению числа Ia-положительных клеток в популяциях лимфоцитов и макрофагов селезенки, так и усилению специфического и неспецифического клеточного иммунного ответа. Полученные результаты свидетельствуют о том, что активация АПК и повышение экспрессии АГ ГКГ класса II под влиянием цитокинов является одним из механизмов, за счет которого опосредуется иммуноадьювантное действие цитокинов.

2.7. Определение содержания цитокинов в противовирусных вакцинах

В результате проведенных исследований установлено, что все изученные противовирусные вакцины, при производстве которых в качестве субстрата используются клетки млекопитающих, содержат провоспалительные цитокины (ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО α) (Таблица 9).

Наиболее высокий уровень ИЛ-1 β (130,8 пг/мл) выявлен в вакцине против гепатита А. В полиомиелитной вакцине, изготовленной на клеточной линии VERO, ИЛ-1 β не обнаружен. Содержание ИЛ-1 β в остальных вакцинах было в пределах от 20 до 35 пг/мл.

Наиболее высокий уровень ИЛ-6 выявлен в антирабической вакцине (833,3 МЕ/мл), наименьшее содержание обнаружено в вакцине против гепатита А и в полиомиелитной

моновакцине 3 типа, изготовленной на культуре клеток ПЗМ (0,9 МЕ/мл и 2,4 МЕ/мл, соответственно). Содержание ИЛ-6 в остальных вакцинах составляло от 15 до 72 МЕ/мл.

Таблица 9 - Содержание цитокинов в вакцинах и супернатантах клеточных культур

Название препарата	ИЛ-1 β (пг/мл)	ИЛ-6 (МЕ/мл)	ФНО α (пг/мл)
Антирабическая вакцина (клеточная культура ПСХ)	н/о	833,3 \pm 211,8 (410-1060)	0
Полиомиелитная вакцина типов 1,2,3 (клеточная культура ПЗМ)	26,0 \pm 4,0 (19-55)	62,0 \pm 13,3 (44-88)	779,0 \pm 96,0 (380-1280)
Полиомиелитные моновакцины на клеточной культуре ПЗМ			
а) 1 типа	24,0 \pm 3,1 (17-30)	44,0 \pm 7,6 (28-59)	30,0 \pm 9,2 (11-48)
б) 2 типа	35,5 \pm 4,5 (31-40)	48,0 \pm 12,4 (23-72)	40,0 \pm 10,0 (30-60)
в) 3 типа	20,0 \pm 3,8 (12-27)	2,4 \pm 0,6 (1,2-3,7)	45,0 \pm 15,0 (30-60)
Супернатант клеток ПЗМ	0	н/о	0
Полиомиелитная вакцина типов 1,2,3 (клеточная линия VERO)	0	15,0 \pm 4,0 (11-19)	2830,0 \pm 30,0 (2800-2860)
Супернатант клеток линии VERO	0	0	0
Коревая вакцина (клеточная культура Л-68)	27,0 \pm 8,0 (19-35)	71,5 \pm 32,1 (39-103)	600,0 \pm 79,0 (520-680)
Супернатант клеток Л-68	0	0,8	0
Вакцина против гепатита А (клеточная линия 4647)	130,8 \pm 12,8 (108-165)	0,9 \pm 0,3 (0,4-1,5)	575,0 \pm 39,0 (500-680)
Супернатант клеток линии 4647	0	н/о	0

Примечание: - н/о - не определяли

- в скобках указаны пределы колебаний соответствующих показателей

Наиболее высокий уровень ФНО α выявлен в полиомиелитной вакцине, изготовленной на клеточной линии VERO (2830 пг/мл). В антирабической вакцине ФНО α не обнаружен. Содержание ФНО α в полиомиелитной вакцине, изготовленной на культуре клеток ПЗМ, в коревой вакцине и вакцине против гепатита А было в пределах от 575 до 779 пг/мл. В полиомиелитных моновакцинах, изготовленных на культуре клеток ПЗМ, концентрация ФНО α была на уровне 30-45 пг/мл. В субстратах, используемых для производства указанных вакцин, цитокины не выявлены, за исключением диплоидной клеточной линии Л-68.

Таким образом, перечень и содержание цитокинов зависят от вида вакцин, при этом в отдельных вакцинах концентрация цитокинов варьировала от серии к серии. Выявленные концентрации цитокинов в вакцинах в некоторых случаях превышали значения уровня этих цитокинов в сыворотке крови здоровых доноров, но при этом были значительно ниже доз, используемых при изучении адьювантного эффекта цитокинов, а также ниже терапевтических доз лекарственных препаратов на основе исследованных цитокинов.

2.8. Изучение спонтанной и индуцированной выработки цитокинов

Для выяснения источника появления цитокинов в противовирусных вакцинах изучена спонтанная и индуцированная вирусом полиомиелита 1, 2, 3 типов выработка цитокинов

(ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО α) клеточными культурами, используемыми в качестве субстратов при производстве вакцин. Установлено, что диплоидные клеточные линии секретировали цитокины спонтанно, а первичная культура клеток (ПЗМ) и перевиваемые клеточные линии (VERO, 4647) не обладали такой способностью (Таблица 10).

Таблица 10 - Спонтанный и индуцированный вирусом полиомиелита синтез цитокинов клеточными культурами, используемыми при производстве вакцин

Супернатанты клеточных культур	ИЛ-1β (пг/мл)	ИЛ-6 (МЕ/мл)	ФНОα (пг/мл)
Клетки линии ПЗМ			
- без стимуляции	0	н/о	0
- стимуляция - 1 типом	34,3 \pm 6,3	12,0 \pm 2,8	501,7 \pm 208,0
- 3 типом	0	2,3 \pm 0,7	95,0 \pm 65,0
Клетки линии М-22			
- без стимуляции	0	0,3	190,0 \pm 58,0
- стимуляция - 1 типом	0	66,1 \pm 16,2	810,0 \pm 266,6
- 2 типом	0	156,4 \pm 48,6	622,5 \pm 126,9
- 3 типом	0	1,8 \pm 0,6	618,0 \pm 190,9
Клетки линии 4647			
- без стимуляции	0	н/о	0
- стимуляция - 1 типом	36,0 \pm 5,8	н/о	140,0 \pm 32,4
- 2 типом	102,0 \pm 11,3	н/о	135,0 \pm 5,0
- 3 типом	0	н/о	40,0 \pm 5,9

Примечание: - н/о - не определяли

Синтез цитокинов клеточными культурами отмечен при антигенной стимуляции вирусом полиомиелита, при этом выявлена зависимость выработки цитокинов от типа вируса. Под влиянием вируса полиомиелита 1 типа отмечен более высокий уровень продукции ФНО α всеми клеточными культурами. Под влиянием вируса полиомиелита 2 типа установлена наибольшая продукция ИЛ-1 β клеточной линией 4647; ИЛ-6 – культурой клеток М-22. При воздействии вируса полиомиелита 3 типа, по сравнению с вирусами 1 и 2 типа, отмечен более низкий уровень продукции ИЛ-6 всеми исследуемыми культурами; ФНО α – культурами клеток ПЗМ и 4647; не выявлено стимуляции выработки ИЛ-1 β .

Диплоидная клеточная линия М-22 секретировала цитокины как спонтанно, так и под воздействием вируса. Первичная культура клеток (ПЗМ) и перевиваемая клеточная линия (4647) секретировали цитокины только при стимуляции. Наибольшая продукция цитокинов наблюдалась под воздействием вируса полиомиелита 1 и 2 типов. Перечень и концентрация цитокинов зависят от клеточной культуры и типа вируса.

Таким образом, в исследованных противовирусных вакцинах обнаружены цитокины с провоспалительной активностью. Значимость выявления цитокинов в вакцинных препаратах важна в плане последующей оценки их влияния на иммуногенность вакцин. Обладая широким спектром биологического действия, цитокины могут оказывать иммуномодулирующий эффект, потенцируя и/или подавляя развитие иммунного ответа на вакцины. Установлена способность клеточных культур, используемых в качестве субстрата в производстве вакцин, вырабатывать цитокины спонтанно и/или под воздействием вируса.

Оценка указанных свойств клеточных культур может быть использована при подборе клеточного субстрата для новых противовирусных вакцин.

Необходимо подчеркнуть, что вопросы безопасности применения адъювантов требуют всестороннего изучения их влияния на иммунный ответ, поскольку, обладая собственными фармакологическими свойствами, адъюванты могут влиять на иммуногенность и безопасность вакцин. В своих исследованиях мы изучали адъювантные свойства рекомбинантных цитокинов человека, которые являются действующими веществами биотехнологических лекарственных препаратов. При разработке лекарственных средств, включая препараты на основе цитокинов, полученных методами рекомбинантных ДНК, существует необходимость в выполнении специальных требований, как к оценке качества готового препарата, так и его изучению на этапе доклинических исследований.

Следующий раздел работы посвящен совершенствованию нормативной документации, регламентирующей требования к оценке качества биотехнологических лекарственных препаратов, а также разработке рекомендаций, включающих основные принципы проведения доклинических исследований биотехнологических лекарственных препаратов, адъювантов и вакцин с адъювантами, при их гармонизации с международными требованиями и рекомендациями ВОЗ.

Требования к качеству субстанции и лекарственной формы биотехнологических лекарственных препаратов отражены в ОФС 1.7.1.0007.15 «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК», ГФ РФ XIV издания.

Рекомендации по проведению исследований и основные принципы оценки эффективности и безопасности на этапе доклинического изучения адъювантов и вакцин с адъювантами, а также биотехнологических лекарственных препаратов отражены в соответствующих главах Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Том II) и Руководства по экспертизе лекарственных средств (Том III), изданных ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

Рекомендации по проведению исследований и основные принципы оценки эффективности и безопасности на этапе доклинического изучения адъювантов и вакцин с адъювантами отражены в Правилах проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза, глава 16. «Адъюванты вакцин для лечения и профилактики заболеваний человека» (утверждены 03.11.2016 г.).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на различных экспериментальных моделях установлена способность отдельных цитокинов усиливать иммуногенные свойства исследованных вакцин. Показано, что сочетанное применение цитокинов с вакцинами способствует повышению резистентности экспериментальных животных к заражению вирусами бешенства и клещевого энцефалита; увеличению титров протективных АТ при заражении животных вирусом бешенства; снижению дозы вакцины, индуцирующей развитие иммунитета, обеспечивающего защиту животных при заражении вирусом клещевого энцефалита; проявлению иммунизирующего эффекта малых доз вакцины против гепатита В; преодолению специфической неотвечаемости иммунодефицитных животных при иммунизации против гепатита В; повышению титров специфических АТ к вирусу гепатита А

и достижению 100 % сероконверсии при иммунизации животных против вирусов гепатита А и гепатита В. При этом степень и характер стимуляции зависит от свойств самого цитокина и от вида иммунитета, который развивается при введении конкретной вакцины. Применение комплекса цитокинов позволяет уменьшить используемые дозы вакцины.

Цитокины, как иммуноадьюванты нового поколения, можно использовать для избирательного усиления защитных механизмов, вызывая развитие тех форм иммунного ответа, которые необходимы организму для защиты от конкретного возбудителя заболевания. Введение цитокинов, выполняющих роль эндогенных медиаторов иммунного ответа, найдет широкое применение в практике для коррекции развития иммунитета при введении вакцин как метод персонализации вакцинации.

Следует отметить, что вакцины, являясь основным средством предупреждения инфекционных заболеваний, нуждаются в совершенствовании. Иммуногенность некоторых из них недостаточна, они не создают надежной иммунологической памяти. Отсюда необходим поиск новых средств и способов усиления иммуногенной активности вакцин. Адьювантами вакцин, как показали наши исследования, могут быть цитокины, которые являются естественными регуляторами развития иммунитета.

Перспективы дальнейшей разработки темы определяют необходимость экспериментального и клинического изучения адьювантного действия лекарственных препаратов цитокинов при сочетанном введении с вакцинами.

Для персонализированного подхода к вакцинации лиц с дисфункцией иммунной системы необходимы дальнейшие исследования по выбору конкретных схем вакцинации с использованием лекарственных препаратов цитокинов в качестве адьювантов.

Оценка значимости присутствия цитокинов в вакцинах и изучение способности клеток, используемых в качестве субстратов при производстве вакцин, продуцировать цитокины, требует проведения дальнейших исследований.

Учитывая, что цитокины и вся цитокиновая сеть обеспечивают взаимодействие клеток при всех биологических процессах и лежат в основе молекулярно-клеточных механизмов не только в норме, но и при патологии, использование препаратов, воздействующих на отдельные звенья цитокиновой сети для стимуляции не только иммунитета, но и других физиологических функций организма, является важной перспективной задачей практического здравоохранения.

ВЫВОДЫ

1. Экспериментально подтверждена целесообразность использования цитокинов в качестве адьювантов противовирусных вакцин. На различных моделях (мыши, морские свинки) показано, что препараты цитокинов (рЧИЛ-1β, рЧИЛ-2, рЧФНОα, тимозин альфа 1, гибридный белок «Неотим», фактор переноса - «Аффинолейкин») повышают иммуногенную активность вакцин против бешенства, клещевого энцефалита, гепатита А и гепатита В при сочетанном применении. Использование цитокинов позволяет снизить дозы вакцин без потери их иммуногенности. Для достижения желаемого адьювантного эффекта для каждого вида вакцин, индуцирующих формирование гуморального и/или клеточного иммунитета, необходим свой набор цитокинов, стимулирующих соответствующий тип иммунного ответа.

2. Использование цитокинов рЧИЛ-1β и рЧФНОα в виде монопрепаратов или комплекса, включающего рЧИЛ-1β, рЧИЛ-2 и рЧФНОα, в качестве адьювантов при

иммунизации антирабической вакциной (КОКАВ) повышает протективный эффект вакцины, оцениваемый по уровню резистентности лабораторных животных к заражению фиксированным вирусом бешенства. У животных, иммунизированных КОКАВ на фоне введения цитокинов, наблюдалась активация системы гуморального и клеточного иммунитета, о чем свидетельствует повышение титра специфических вируснейтрализующих антител, усиление антигенспецифической, митоген-индуцированной и спонтанной пролиферации лимфоцитов, увеличение количества Т-хелперов и числа Ia-положительных клеток во фракциях лимфоцитов и макрофагов селезенки экспериментальных животных.

3. Цитокины (рчИЛ-1 β и рчФНО α , гибридный белок «Неотим») и препарат «Имунофан» при сочетанном введении повышают иммуногенную активность вакцины против клещевого энцефалита в 1,3-1,5 раза, что обеспечивает более высокий уровень резистентности мышей линии Balb/c к заражению вирулентным штаммом вируса клещевого энцефалита (тест-штамм «Абсеттаров»). Протективный эффект вакцины повышается на фоне активации показателей специфического клеточного иммунного ответа.

4. Сочетанное введение цитокинов (рчИЛ-1 β , рчФНО α , тимозин альфа 1, гибридный белок «Неотим») и препарата «Имунофан» с вакциной против гепатита А способствует повышению иммуногенной активности вакцины, вызывая формирование антител к вирусу гепатита А в более высоких титрах, в 2,7-10 раз превышающих показатели контрольной группы животных, иммунизированных одной вакциной, и обеспечивая 100 % сероконверсию животных; уровень сероконверсии в контрольной группе составляет 72,6 - 88,8 %.

5. Иммунизация экспериментальных животных конъюгированной вакциной против гепатита А в сочетании с рчФНО α оказывает стимулирующее действие на иммуногенную активность вакцины. При этом уровень синтеза специфических антител к вирусу гепатита А и частота их выявления превышают аналогичные показатели контрольной группы животных, иммунизированных конъюгированной вакциной без цитокина.

6. Препараты цитокинов (рчИЛ-1 β , рчИЛ-2, фактор переноса) и препарат «Имунофан» усиливают иммунный ответ экспериментальных животных, оцениваемый по уровню сероконверсии, при иммунизации вакциной против гепатита В. Интенсивность иммунного ответа на низкие дозы вакцины, используемые в сочетании с препаратами рчИЛ-1 β и рчИЛ-2, соответствует уровню ответа на более высокие дозы вакцины, вводимые без цитокинов. Малые дозы вакцины против гепатита В, не индуцирующие иммунный ответ, в сочетании с цитокинами приобретают способность проявлять иммунизирующий эффект, что свидетельствует о возможности преодоления специфической неответственности с помощью цитокинов, используемых в качестве адъювантов.

7. Наиболее значимо адъювантное действие препаратов рчИЛ-1 β и рчИЛ-2 проявляется на экспериментальной модели животных с наличием иммуносупрессии, индуцированной циклофосфаном. Уровень иммунного ответа животных с иммуносупрессией, иммунизированных вакциной в дозах 0,83 и 0,27 мкг/мышь, составляет 50,0 и 55,5 %. При введении вакцины с препаратами цитокинов уровень сероконверсии повышается до 87,5 и 62,5 %, что соответствует уровню ответа животных без иммуносупрессии при введении вакцины в аналогичных дозах без цитокинов (68,6 и 70,0 %, соответственно).

8. При использовании клеток мышей линии СВА, которые являются слабо отвечающими на полипептид (Т,Г)-А-Л, формирование клеточного иммунного ответа в условиях *in vitro*, оцениваемого по способности клеток-эффекторов гиперчувствительности замедленного типа продуцировать фактор торможения миграции макрофагов, отмечено только при использовании в качестве антигена полипептида (Т,Г)-А-Л, конъюгированного с Полиоксидонием.

9. Одним из механизмов, за счет которого опосредуется иммуноадьювантное действие цитокинов, кроме непосредственного эффекторного действия цитокинов, является активация антиген-презентирующих клеток и повышение экспрессии антигенов главного комплекса гистосовместимости класса II под влиянием цитокинов. Модуляция уровня экспрессии указанных антигенов за счет стимуляции препаратами интерферона и блокады с помощью МкАТ к АГ ГКГ класса II изменяет уровень иммунного ответа в условиях *in vitro*. Отмечена корреляция уровня экспрессии АГ ГКГ на иммунокомпетентных клетках с выраженностью иммунного ответа животных, иммунизированных антирабической вакциной КОКАВ в сочетании с комплексом цитокинов.

10. Противовирусные вакцины (антирабическая, полиомиелитная, коревая, против гепатита А) содержат провоспалительные цитокины (ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО α). Спектр и концентрация выявляемых цитокинов зависят от вида вакцины. Источником цитокинов являются клеточные культуры, используемые в качестве субстратов при производстве вакцин, одни из которых продуцируют цитокины спонтанно, а другие – при антигенной стимуляции вирусом. При выборе клеточных культур для разработки новых вакцинных препаратов целесообразно оценивать их способность к спонтанной или антиген-индуцированной продукции цитокинов.

11. О перспективности использования цитокинов в качестве адьювантов свидетельствуют обобщенные результаты изучения их влияния на иммунизирующий эффект противовирусных вакцин. Сочетанное применение вакцин с цитокинами способствует формированию более выраженного гуморального и клеточного иммунитета; снижению минимальной иммунизирующей дозы, обеспечивающей защиту животных при заражении вирусами бешенства и клещевого энцефалита; сокращению сроков формирования иммунного ответа и повышению уровня сероконверсии при иммунизации вакцинами против гепатита А и гепатита В; преодолению специфической неответственности на минимальные дозы вакцины против гепатита В; развитию полноценного иммунного ответа на вакцину против гепатита В у животных с иммунодефицитным состоянием.

12. Усовершенствованы нормативные документы и методические рекомендации, в которых отражены требования к оценке качества и проведению доклинических исследований биотехнологических лекарственных препаратов, а также основные принципы проведения доклинических исследований препаратов, рассматриваемых в качестве адьювантов и вакцин с адьювантами. Требования, изложенные в разработанных документах, гармонизированы с международными требованиями нормативных документов стран с развитой регуляторной системой и рекомендациями ВОЗ.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Научные статьи

1. Медуницын, Н.В. Образование эффекторных клеток замедленной чувствительности к синтетическим антигенам *in vitro* / Н.В. Медуницын, О.Р. Крылов, **Н.А. Алпатова**, Н.Г. Пучкова // **Иммунология**. – 1986. – №1 – С. 43-46.
2. Медуницын, Н.В. Ia-молекулы как универсальные рецепторы нативного антигена / Н.В. Медуницын, Ж.И. Авдеева, О.Р. Крылов, **Н.А. Алпатова**, О.Г. Степанов // **Иммунология**. – 1992. – №3. – С. 18-21.
3. Акользина, С.Е. Цитокины в вакцинах и препаратах интерферона / С.Е. Акользина, Ж.И. Авдеева, М.П. Потапнев, А.В. Вознюк, Л.В. Невская, **Н.А. Алпатова**, Г.Г. Тер-Габриэлянц, Н.В. Медуницын // **Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии**. – 1996. – N.6. – С. 36-38.
4. Медуницын, Н.В. Содержание цитокинов в иммунобиологических препаратах / Н.В. Медуницын, Ж.И. Авдеева, С.Е. Акользина, М.П. Потапнев, А.В. Вознюк, Л.В. Невская, **Н.А. Алпатова**, Г.Г. Тер-Габриэлянц, Н.В. Варданян, Л.Л. Миронова, В.Д. Попова // **Иммунология**. – 1997. – № 2. – С. 42-45.
5. Медуницын, Н.В. Цитокины и вакцины / Н.В. Медуницын, Ж.И. Авдеева, **Н.А. Алпатова**, С.Е. Акользина // **Медицинская иммунология**. – 2001. – 3 (3). – С. 439-447.
6. Medynitsin, N.V. Presence of cytokines in biological preparations / N.V. Medynitsin, J.I. Avdeeva, S.E. Acolzina, N.A. Alpatova, L.V. Nevskaya // **Biologicals**. – 2002. – V.30. – P. 1-6.
7. Авдеева, Ж.И. Влияние цитокинов на иммуногенные свойства вакцины против гепатита А / Ж.И. Авдеева, С.Е. Акользина, **Н.А. Алпатова**, Н.В. Медуницын // **Вопросы вирусологии**. – 2005. – № 2. – С. 23-27.
8. Авдеева, Ж.И. Действие цитокинов на протективные свойства антирабической вакцины / Ж.И. Авдеева, С.Е. Акользина, **Н.А. Алпатова**, А.А. Мовсесянц, Н.В. Медуницын // **Цитокины и воспаление**. – 2007. – Т. 6, №2. – С. 46-50.
9. Авдеева, Ж.И. Показатели клеточного иммунного ответа при иммунизации мышей антирабической вакциной на фоне цитокинов / Ж.И. Авдеева, С.Е. Акользина, **Н.А. Алпатова**, Н.В. Медуницын // **Цитокины и воспаление**. – 2008. – Т. 7, №4. – С. 15-20.
10. Авдеева, Ж.И. Иммуноадыювантный эффект цитокинов / Ж.И. Авдеева, **Н.А. Алпатова**, С.Е. Акользина, В.И. Масычева, Н.В. Медуницын // **Тихоокеанский медицинский журнал**. – 2009. – № 3. – С. 19-22.
11. Авдеева, Ж.И. Цитокины и вакцины / Ж.И. Авдеева, **Н.А. Алпатова**, С.Е. Акользина, Н.В. Медуницын // **Тихоокеанский медицинский журнал**. – 2009. – №3. – С. 22-27.
12. Авдеева, Ж.И. Влияние цитокинов на иммуногенные свойства вакцины против клещевого энцефалита / Ж.И. Авдеева, С.Е. Акользина, **Н.А. Алпатова**, Т.Н. Никитина, М.Н. Ращепкина, Н.В. Медуницын // **Цитокины и воспаление**. – 2009. – Т. 8, №2. – С. 16-21.
13. Авдеева, Ж.И. Общие принципы разработки программы доклинических испытаний иммунобиологических лекарственных препаратов, полученных с использованием методов геной инженерии / Ж.И. Авдеева, Р.А. Волкова, **Н.А. Алпатова**, И.В. Борисевич // **Цитокины и воспаление**. – 2011. – Т. 10, №4. – С. 5-10.

14. Авдеева, Ж.И. Показатели иммунного ответа при иммунизации животных вакциной против клещевого энцефалита в сочетании с цитокинами / Ж.И. Авдеева, С.Е. Акользина, **Н.А. Алпатова**, Н.В. Медуницын // **Цитокины и воспаление**. – 2013. – Т. 12, №4. – С. 38-42.
15. Авдеева, Ж.И. Особенности доклинических исследований биотехнологических лекарственных препаратов / Ж.И. Авдеева, **Н.А. Алпатова**, А.А. Солдатов, В.П. Бондарев, Н.Д. Бунятян, В.А. Меркулов, Н.В. Медуницын, В.Д. Мосягин // **Иммунология**. – 2015. – Т. 36, №5. – С. 306-312.
16. Алпатова, Н.А. Принципы оценки специфической активности биотехнологических лекарственных препаратов / **Н.А. Алпатова**, Ж.И. Авдеева, А.А. Солдатов, В.П. Бондарев, Н.В. Медуницын // **Цитокины и воспаление**. – 2015. – Т. 14, №3. – С. 12-16.
17. Алпатова, Н.А. Цитокины как адъюванты вакцин / **Н.А. Алпатова**, Ж.И. Авдеева, Н.В. Медуницын // **Российский аллергологический журнал**. – 2018. – Т. 15, №1, часть 2. – С. 7-10.
18. Алпатова, Н.А. Экспериментальное изучение роли цитокинов с целью повышения иммуногенной активности антирабических вакцин (обзор) / **Н.А. Алпатова**, Ж.И. Авдеева, А.А. Мовсисянц, Н.В. Медуницын // **Иммунология**. – 2018. – Т. 39, №2-3. – С. 143-151.
19. Алпатова, Н.А. Преодоление неответности на вакцину против гепатита В с помощью адъювантов / **Н.А. Алпатова**, Ж.И. Авдеева, Т.Н. Никитина, Н.В. Медуницын, В.А. Меркулов // **Российский аллергологический журнал**. – 2019. – Т. 16, №1, часть 2. – С. 11-14.
20. Алпатова, Н.А. Стимуляция иммунного ответа на вакцину против клещевого энцефалита / **Н.А. Алпатова**, Ж.И. Авдеева, Н.В. Медуницын, Ю.В. Олефир // **Российский аллергологический журнал**. – 2019. – Т. 16, №1, часть 2. – С. 14-17.
21. Медуницын, Н.В. Моделирование реакций повышенной чувствительности замедленного типа *in vitro* / Н.В. Медуницын, О.Р. Крылов, Н.А. Алпатова, Ж.И. Авдеева // «Проблемы и перспективы современной иммунологии. Методологический анализ». – Новосибирск. – 1988. – С. 108-123.
22. Авдеева, Ж.И. Вакцины с адъювантами. Доклинические исследования / Ж.И. Авдеева, Н.А. Алпатова, В.П. Бондарев, Р.А. Волкова, Н.И. Лонская, Е.В. Лебединская, Н.В. Медуницын, А.Н. Миронов, Н.А. Озерецковский, А.А. Солдатов, В.А. Шевцов // **БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение** – 2015. – №1. – С. 15-20.
23. Алпатова, Н.А. Особенности определения специфической активности биотехнологических лекарственных средств / Н.А. Алпатова, Л.А. Гайдерова, А.К. Яковлев, Е.В. Мотузова, С.Л. Лысикова, А.А. Солдатов, Ж.И. Авдеева // **БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение**. – 2017. – Т. 17, №1. – С. 13-26.

Публикации в материалах научных форумов и конференций

1. Medunitsin, N.V. Formation of effector cells of delayed type hypersensitivity *in vitro* / N.V. Medunitsin, O.R. Krylov, J.I. Avdeeva, N.A. Alpatova // **Abstr. Sixth international congress of immunol.** – Toronto, Canada. – 1986. – Abstr./Post. N 2.44.32. – P. 173.

2. Medunitsin, N.V. Expression of MHC class II antigens on immunocompetent cells and its importance for immune response development / N.V. Medunitsin, J.I. Avdeeva, O.R. Krylov, V.I. Karaseva, S.G. Kremlev, N.A. Alpatova // Abstr. IX Europ. Immunology Meeting. – Roma-Italy-Palazzo dei Congressi. – 1988. – Poster W3-21. – P. 35.
3. Медуницын, Н.В. Продукты генов главного комплекса гистосовместимости класса II как универсальные рецепторы нативного антигена и хранители антигенной информации / Н.В. Медуницын, Ж.И. Авдеева, Н.А. Алпатова // Сборник материалов Международного симпозиума по аллергологии и клинической иммунологии. Тезисы докладов. – Алма-Ата. – 1992. – С. 200.
4. Медуницын, Н.В. Цитокины как стимуляторы поствакцинального иммунитета / Н.В. Медуницын, С.Е. Акользина, Ж.И. Авдеева, Н.А. Алпатова, В.А. Шмелев, В.В. Лебедев, О.Г. Степанов // Сборник материалов II Российского национального конгресса «Человек и лекарство». Тезисы докладов. – Москва. – 1995. – С. 39.
5. Медуницын, Н.В. Цитокины в иммунобиологических препаратах / Н.В. Медуницын, Л.В. Невская, С.Е. Акользина, Н.А. Алпатова, Г.Г. Тер-Габриэлянц, Ж.И. Авдеева // Сборник материалов II Российского национального конгресса «Человек и лекарство». Тезисы докладов. – Москва. – 1995. – С. 39.
6. Медуницын, Н.В. Разработка новых лекарственных средств – цитокинов / Н.В. Медуницын, Ж.И. Авдеева, С.Е. Акользина, Н.А. Алпатова, Г.Г. Тер-Габриэлянц, Н.М. Пустошилова, В.И. Масычева // Сборник материалов III Российского национального конгресса «Человек и лекарство». Тезисы докладов. – Москва. – 1996. – С. 36.
7. Медуницын, Н.В. Цитокины и вакцины / Н.В. Медуницын, С.Е. Акользина, Ж.И. Авдеева, Н.А. Алпатова, Л.В. Невская, Л.Г. Карпович, Т.В. Калашникова, В.Д. Левина, Т.Н. Ермолаева // Сборник материалов II Международного конгресса по иммунореабилитации в медицине. – Анталия (Турция). – 1996. – С. 66.
8. Авдеева, Ж.И. Цитокины и поствакцинальный иммунитет / Ж.И. Авдеева, Н.В. Медуницын, С.Е. Акользина, Н.А. Алпатова, Л.В. Невская // Сборник материалов IV Российского национального конгресса «Человек и лекарство». Тезисы докладов. – Москва. – 1997. – С. 69.
9. Акользина, С.Е. Адьювантные свойства цитокинов / С.Е. Акользина, Ж.И. Авдеева, Н.А. Алпатова, Н.В. Медуницын // Сборник материалов 2-го Национального конгресса РААКИ «Современные проблемы аллергии, клинической иммунологии и иммунофармакологии». Тезисы докладов. – Москва. – 1998. – С. 260.
10. Медуницын, Н.В. Цитокины в современной вакцинологии / Н.В. Медуницын, С.Е. Акользина, Ж.И. Авдеева, Н.А. Алпатова // Сборник материалов 2-ой Международной конференции «Идеи Пастера в борьбе с инфекциями», посвященной 75-летию Института им. Пастера. Тезисы докладов. – С.-Петербург. – 1998. – С. 51.
11. Авдеева, Ж.И. Оптимизация вакцинального процесса с помощью цитокинов / Ж.И. Авдеева, С.Е. Акользина, Н.А. Алпатова, Н.В. Медуницын // Russian Journal of Immunology. – 1999. – Vol.4, Suppl. 1. – P. 54.
12. Авдеева, Ж.И. Оптимизация вакцинального процесса с помощью цитокинов и Полиоксидония / Ж.И. Авдеева, Н.А. Алпатова, Н.В. Медуницын // Сборник материалов 4

Конгресса РААКИ «Современные проблемы аллергологии, клинической иммунологии и иммунофармакологии». Тезисы докладов. – Москва. – 2001. – С. 371.

13. Авдеева, Ж.И. Использование цитокинов в качестве иммуноадьювантов / Ж.И. Авдеева, Н.А. Алпатова, С.Е. Акользина, Н.В. Медуницын // Аллергология и иммунология. – 2001. – Т.2, № 2. – С. 18

14. Авдеева, Ж.И. Цитокины в иммунобиологических препаратах / Ж.И. Авдеева, С.Е. Акользина, Н.А. Алпатова, Н.В. Медуницын // Аллергология и иммунология. – 2001. – Т.2, № 2. – С. 19

15. Авдеева, Ж.И. Цитокины и иммунный ответ на вакцины против вирусных гепатитов / Ж.И. Авдеева, Н.А. Алпатова, Т.В. Калашникова, Н.В. Медуницын // Медицинская иммунология. – 2002. – Т.4, № 2. – С. 225-226.

16. Авдеева, Ж.И. Лекарственные препараты системы цитокинов / Ж.И. Авдеева, Н.А. Алпатова, Н.В. Медуницын // Сборник материалов 5-го Конгресса «Современные проблемы аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии». – Москва. – 2002. – Т.2. – С. 235.

17. Медуницын, Н.В. Препараты на основе цитокинов для иммунотерапии / Н.В. Медуницын, Ж.И. Авдеева, Н.А. Алпатова // Сборник материалов 5-го Конгресса «Современные проблемы аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии». Актовые и пленарные лекции. – Москва. – 2002. – Т.1. – С. 381-397.

18. Никитина, Т.Н. Цитокины как иммуноадьюванты / Т.Н. Никитина, Ж.И. Авдеева, Н.А. Алпатова // Сборник материалов XIII Всероссийского научного Форума с международным участием им. акад. В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге». – Медицинская иммунология. – 2009. – Т. 11, № 4-5. – С. 328-329.

19. Авдеева, Ж.И. Адьювантные свойства препаратов цитокинов и их стандартизация / Ж.И. Авдеева, Н.А. Алпатова, Т.Н. Никитина // Сборник материалов Всероссийской научной конференции «Молекулярно-генетические основы функционирования цитокиновой сети в норме и при патологии» 15-17 сентября 2010. г. Новосибирск. – 2010. – С. 75.

20. Алпатова, Н.А. Иммуноадьювантное действие препаратов цитокинового ряда / Н.А. Алпатова, Т.Н. Никитина, Ж.И. Авдеева // Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции «Вакцинология 2010. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней», 09-10 ноября 2010. Москва. – 2010. – С. 20.

21. Авдеева, Ж.И. Программа доклинических испытаний иммунобиологических генно-инженерных лекарственных препаратов / Ж.И. Авдеева, Н.А. Алпатова, Р.А. Волкова, А.К. Яковлев, И.В. Борисевич // Сборник материалов IV съезда фармакологов России «Инновации в современной фармакологии» 18-21 сентября 2012. Татарстан. – Казань. – 2012. – С. 6-7.

22. Авдеева, Ж.И. Вопросы обеспечения безопасности применения биотехнологических лекарственных препаратов / Ж.И. Авдеева, А.А. Солдатов, Н.А. Алпатова, Н.В. Медуницын, В.П. Бондарев, В.А. Меркулов // Аллергология и иммунология. – 2013. – Т.14, № 3. – С. 186.

23. Авдеева, Ж.И. Доклинические исследования безопасности биотехнологических лекарственных препаратов / Ж.И. Авдеева, А.А. Солдатов, Н.А. Алпатова, В.Д. Мосягин, Н.В. Медуницын // Сборник материалов научно-практической конференции «Актуальные вопросы промышленной токсикологии». Москва, 26-27 ноября 2014 г. – М.: Изд-во «Перо». – 2014. – С. 259-263.
24. Алпатова, Н.А. Использование цитокинов для стимуляции специфического иммунного ответа / Н.А. Алпатова, Ж.И. Авдеева, С.Е. Акользина, Н.В. Медуницын // Медицинская иммунология. – 2015. – Т. 17. Специальный выпуск. – С. 9.
25. Алпатова, Н.А. Участие антигенов гистосовместимости класса II в механизмах стимуляции иммунного ответа / Н.А. Алпатова, Ж.И. Авдеева, С.Е. Акользина, Н.В. Медуницын // Медицинская иммунология. – 2015. – Т. 17. Специальный выпуск. – С. 57.
26. Авдеева, Ж.И. Генно-инженерные лекарственные препараты (проблемы и перспективы) / Ж.И. Авдеева, Н.А. Алпатова, Ю.В. Олефир, В.А. Меркулов, В.П. Бондарев // Сборник материалов XIV международной конференции «Высокие медицинские технологии XXI века» 24-31 октября 2015 года. Испания, Бенидорм. – Бенидорм. – 2015. – С. 19.
27. Алпатова, Н.А. Влияние цитокинов на иммунный ответ к антигенам гепатитов А и В / Н.А. Алпатова, Л.В. Невская, Н.В. Медуницын // Медицинская иммунология. Специальный выпуск. – 2017. – Т.19. – С. 145.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

- АГ – антиген
 АПК – антиген-презентирующие клетки
 АТ – антитела
 ВКЭ – вакцина против клещевого энцефалита
 ВГА – вирус гепатита А
 ГЗТ – гиперчувствительность замедленного типа
 ГКГ – главный комплекс гистосовместимости
 ИЛ – интерлейкин
 ИЛП – иммунобиологические лекарственные препараты
 ИФ – интерферон
 ИФА – иммуноферментный анализ
 КонА – конканавалин А (митоген)
 КПЭ – клетки перитонеального экссудата
 МИФ – фактор торможения миграции макрофагов
 МкАТ – моноклональные антитела
 ОВА – овалбумин (яичный альбумин)
 ПЗМ – почки зеленой мартышки
 ПО – полиоксидоний
 рЧИЛ-1 β – рекомбинантный интерлейкин-1 бета человека
 рчФНО α – рекомбинантный фактор некроза опухоли альфа человека
 РБН – реакция биологической нейтрализации
 РБТЛ – реакция бласттрансформации лимфоцитов
 РТГА – реакция торможения гемагглютинации
 ЦТТ – цитотоксический тест
 ЦФ – циклофосфан
 ФГА – фитогемагглютинин
 ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка