

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЦИТОКИНОВ И СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ИММУНОГЕННОСТИ МЕЛИОИДОЗНЫХ АНТИГЕНОВ

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», Волгоград, Российская Федерация

Изучали возможность повышения иммунного ответа на липосомальные мелиоидозные антигены за счет включения в схему иммунизации рекомбинантных цитокинов и синтетических иммуномодуляторов (ИМ) – аналогов гормонов тимуса – бестима и имунофана. Белых мышей иммунизировали двукратно с интервалом 10 дней, вводя, помимо специфических антигенов, препараты цитокинов (ИФН- γ – при первичной, ИЛ-2 – при вторичной иммунизации) и ИМ – бестим или имунофан. Показано, что включение в схему иммунизации имунофана, при условии его трехкратного введения при первичной и вторичной иммунизации, способствовало достоверно более высоким показателям ГЗТ по сравнению с однократным введением ИМ, а также приводило к выживанию 50 % животных от 10 ЛД₅₀ высоковирулентного штамма возбудителя мелиоидоза. Замена имунофана бестимом, кроме повышения уровня ГЗТ, существенно увеличивала фагоцитарную активность макрофагов мышей и степень устойчивости животных к контрольному заражению 10 ЛД₅₀ *B. pseudomallei* 100 (61,5 % выживших). Сделан вывод о целесообразности включения бестима в комплексную схему иммунизации против мелиоидоза.

Ключевые слова: липосомальные мелиоидозные антигены, иммунитет, цитокины, бестим, имунофан.

O.B.Dem'yanova, S.I.Zhukova, A.A.Zankovich, N.P.Khrapova, K.A.Rotov, N.N.Sintyurina, E.A.Snatenkov

Application of Cytokines and Synthetic Peptides for Increase in Immunogenicity of Melioidosis Antigens

Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd, Russian Federation

Investigated was the possibility of enhancement of immune response to liposomal melioidosis antigens by means of introduction to immunization schedule injections of recombinant cytokines and synthetic immuno-modulators (IM) – thymus hormone analogues – bestim and imonufan. White mice underwent two-fold immunization in an interval of 10 days, with administration of cytokine preparations (IFN- γ – pre-immunization, IL-2 – booster immunization) and IM – bestim and immunofan, except from specific antigens. It was demonstrated that deployment of immunofan in the immunization schedule, in case of its three-fold administration during pre-immunization phase and secondary immunization, benefited to reasonably higher indexes of delayed-type hypersensitivity (DTH) as compared to single dosing of IM. It also lead to survival of 50 % of animals challenged with LD₅₀ of high-virulent melioidosis agent strain. Apart from high delayed-type hypersensitivity, substitution of immunofan for bestim significantly increased phagocytic activity in mice macrophages and control 10 LD₅₀ *B. pseudomallei* 100 resistance (61.5 % of survived animals). It was concluded that it is a good practice to include bestim in the schedule of complex immunization against melioidosis.

Key words: liposomal melioidosis antigens, immunity, cytokines, bestim, immunofan.

Мелиоидоз является единственной особо опасной инфекцией, против которой еще не создано вакцины, хотя экспериментальные работы в этом направлении продолжают уже более полувека как в нашей стране, так и за рубежом. Отсутствие эффективного профилактического препарата против заболевания, вызываемого *Burkholderia pseudomallei*, связано со слабой иммуногенностью выделенных разными методами мелиоидозных антигенов, хотя определяющая роль поверхностных антигенных структур возбудителя в резистентности к мелиоидозу в настоящее время не вызывает сомнений. Поскольку изученные антигены *B. pseudomallei* вызывают невысокий иммунный ответ, весьма актуальной современной задачей является поиск иммуномодуляторов (ИМ) различной природы, способных повысить иммуногенные свойства мелиоидозных антигенов. Ранее нами было показано, что инкапсулирование по-

верхностных мелиоидозных антигенов в липосомы, а также применение для иммунизации вместе с рекомбинантными цитокинами ИФН- γ и ИЛ-2 способствует повышению их иммуногенных и протективных свойств [6]. В рамках продолжения исследований по поиску новых иммуностимулирующих препаратов целью данной работы было изучение возможности использования синтетических пептидов в схеме иммунопрофилактики экспериментального мелиоидоза. В качестве ИМ были использованы бестим и имунофан. Оба препарата являются синтетическими аналогами активных участков гормона тимуса, достаточно хорошо изучены и показали свою клиническую эффективность при целом ряде инфекционных и соматических заболеваний [4, 5, 6, 9, 10]. Общей отличительной особенностью препаратов является их способность стимулировать преимущественно клеточный иммунитет и фагоцитарные реакции, что

особенно важно при защите от мелиоидозной инфекции. Для профилактики мелиоидоза оба препарата ранее не применялись.

Материалы и методы

Эксперименты проводились на беспородных белых мышах. Для иммунизации животных использовали поверхностный антигенный комплекс из антигена б и антигена d (АГб+d) в дозе 40 мкг по белку, который вводили подкожно двукратно с интервалом 10 сут в липосомальной форме (далее – АГл) [1]. Антигены инкапсулировали в липосомы, которые формировались при смешивании хроматографически чистых фосфатидилхолина и холестерина в соотношении 7:3 [3]. Одновременно с иммунизацией и в последующие 2 сут после нее мышам вводили подкожно цитокиновые препараты: при первичной иммунизации – ИФН-γ (20 МЕ), при вторичной – ИЛ-2 (1 мкг). Бестим или имунофан вводили подкожно при первичной и вторичной иммунизации. Кратность введения ИМ варьировала от одного до трех раз при каждой иммунизации, при этом доза бестима при однократном введении составляла 0,2 мкг, при двукратном и трехкратном введении разовая доза уменьшалась в 2 и 3 раза (0,1 мкг и 0,07 мкг соответственно). Имунофан вводили в разовой дозе 0,02 мкг/мышь, суммарная доза за 2 дня применения имунофана составляла 0,04 мкг, за 3 – 0,06 мкг. Иммунологические показатели клеточного иммунитета – ГЗТ в тесте отека лапок [9] и фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов (ПМ) хемилюминесцентным методом [8] определяли на 18-е сутки после первичной иммунизации, за 3 сут до контрольного заражения. Протективные свойства мелиоидозных антигенов оценивали по показателям летальности (процент выживших и средняя продолжительность жизни (СПЖ)) спустя 30 сут после контрольного заражения животных высоковирулентным штаммом *B. pseudomallei* 100. Полученные данные обрабатывали статистически по Фишеру-Стьюденту [7] и по непараметрическому критерию Вилкоксона [2].

Результаты и обсуждение

В результате проведенного исследования было

Таблица 1

Влияние кратности применения иммуномодулирующих пептидов на клеточный иммунитет мышей, иммунизированных липосомальными мелиоидозными антигенами

Препараты для иммунизации	Уровень ГЗТ на 18-е сутки (ИР, %)		
	Кратность введения ИМ		
	1	2	3
АГл+ ИФН-γ+ ИЛ-2+бестим	22,76±1,85	19,58±1,65	33,37±2,01*
АГл+ ИФН-γ+ ИЛ-2+имунофан	18,6±1,56	21,52±1,93	26,14±2,03**
Контроль (интактные)	4,18±0,85	-	-

* Различия достоверны по отношению 1–2-кратному введению.
 ** Различия достоверны по отношению к 1-кратному введению.

показано, что более высокие иммунологические показатели, характеризующие клеточный иммунитет, зарегистрированы при использовании бестима, причем трехкратная стимуляция мышей бестимом обеспечивала явные преимущества по сравнению с одно- или двукратной ($p < 0,05$). Схема с имунофаном также способствовала формированию у мышей достоверно более высокого уровня ГЗТ, чем у интактных животных, и трехкратное введение препарата было существенно более эффективным, чем однократное ($p < 0,05$), хотя и значимо не отличалось от двукратного введения ИМ ($p > 0,05$) (табл. 1).

Определение уровня хемилюминесцентного ответа ПМ мышей на зимозан на 18-е сутки наблюдения подтвердило большую эффективность трехкратного применения бестима в обеспечении более эффективной стимуляции иммуногенных свойств мелиоидозных антигенов, при этом фагоцитарная активность ПМ достоверно превосходила таковую при одно- и двукратном введении ИМ (рисунок).

Использование схемы с имунофаном также обеспечивало на 18-е сутки существенно более высокие показатели хемилюминесценции ПМ, чем у контрольных интактных мышей ($p < 0,05$), однако кратность введения имунофана значимо не изменяла фагоцитарные показатели ПМ иммунизированных мышей.

Таким образом, бестим и имунофан оказались способными повышать иммуногенные свойства мелиоидозных липосомальных препаратов. Кратность применения бестима существенно отражалась как на уровне ГЗТ, так и на степени фагоцитарной активности ПМ, трехкратное введение было наиболее эффективным. Имунофан по сравнению с бестимом проявил менее выраженное иммуностимулирующее действие, хотя его трехкратное введение и обеспечивало существенно более высокий уровень ГЗТ, чем однократное, но не имело решающего значения для стимуляции фагоцитарной функции Мф мышей.

Изучение протективности мелиоидозных антигенов показало, что при дополнении схемы стимуляции иммуногенеза цитокинами 1–3-кратным введением бестима и при 1–2-кратной стимуляции имунофаном выживаемость животных от 10 ЛД₅₀ *B. pseudomallei* 100 достоверно превышает таковую у интактных животных и составляет 43–61,5 % при использовании бестима и 41,7–50 % при введении имунофана (табл. 2).

Самый низкий показатель летальности от



Влияние кратности применения бестима в процессе иммунизации липосомальными антигенами на фагоцитарную активность ПМ мышей

Влияние кратности применения ИМ на протективность липосомальных мелиоидозных антигенов

Препараты для иммунизации	Летальность при заражении 10 ЛД ₅₀ <i>B. pseudomallei</i> 100								
	Кратность введения ИМ								
	1			2			3		
	пало/взято	% павших	СПЖ	пало/взято	% павших	СПЖ	пало/взято	% павших	СПЖ
АГл+ ИФН-γ+ИЛ-2+ бестим	8/15	53,3*	10,8*	8/14	57,0*	10,4*	5/13	38,5*	11,2*
АГл+ ИФН-γ+ИЛ-2+ имунофан	7/14	50,0*	10,0*	7/14	50,0*	10,2*	7/12	58,3	10,8*
Контроль (интактные)	10/10	100	6,2	-	-	-	-	-	-

* Различия достоверны с группой интактных животных ($p < 0,05$).

10 ЛД₅₀ *B. pseudomallei* 100 (38,5 %) отмечен в группе животных с трехкратной стимуляцией бестимом. Оба синтетических полипептида (бестим и имунофан) обладали способностью повышать защитные свойства мелиоидозных липосомальных антигенов при их совместном применении с цитокинами, стимулирующими механизмы клеточного иммунитета (ИФН-γ и ИЛ-2). При сравнении более эффективным препаратом оказался бестим.

Таким образом, нами показана целесообразность включения в схему стимуляции иммунного ответа при мелиоидозе синтетических пептидов – аналогов активных центров тимических гормонов. Многими авторами отмечено, что защита против мелиоидоза базируется, в основном, на клеточных иммунных реакциях [12, 13], поэтому вполне объяснима показанная нами способность цитокиновых препаратов ИФН-γ и ИЛ-2, ориентирующих иммунный ответ преимущественно по Th1-типу, а также бестима и имунофана, дополнительно действующих в том же направлении, существенно стимулировать иммунные реакции макроорганизма на мелиоидозные антигены и повышать протективность антигенов. Полученные нами данные могут быть использованы для разработки эффективных схем профилактики мелиоидозной инфекции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авророва И.В., Жукова С.И., Корсакова И.И., Храпова Н.П., Напалкова Г.Н. Поверхностные биополимеры *Burkholderia pseudomallei* и их протективная активность при экспериментальном мелиоидозе. *Инф. патол.* 2010; 17(3):85–7.
2. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика; 1998. 459 с.
3. Жукова С.И., Авророва И.В., Прошина О.Б., Ротов К.А., Храпова Н.П., Снатенков Е.А., Ломова Л.В. Способ иммунопрофилактики экспериментального мелиоидоза инкапсулированными антигенами *Burkholderia pseudomallei*. Патент РФ 2373955, опубл. 27.11.2009 г. Бюл. № 33.
4. Караулов А.В. Клинико-иммунологическая эффективность применения имунофана при оппортунистических инфекциях. *Лечащий врач.* 2000; 4:52–5.
5. Караулов А.В., Сокурено С.И. Имунофан: непосредственные и отдаленные результаты лечения больных хроническим бронхитом. *Медикал Маркет.* 2000; 34:21–4.
6. Кукаркин Н.Ю., Долгушин И.И., Бордуновский В.Н. Бестим в лечении больных хроническим пиелонефритом. В кн.: Иммунитет и болезни: от теории к практике. М.; 2005. С. 90–1.
7. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. Киев: Морион; 2001. 408 с.
8. Любимов Г.Ю., Зенков Н.Г., Вольский Н.Н. Хемилюминесценция перитонеальных макрофагов при действии макрофаг-активирующего фактора. *Иммунология.* 1992; 1:40–3.
9. Попова А.Е. Методические рекомендации по опреде-

лению отекогенного эффекта на белых мышцах. Волгоград: Нижневолжское книжное изд-во; 1980. 18 с.

10. Сенцова Т.Б. Современные иммуномодуляторы. *Оториноларингология.* 2004; 3(5):16–8.

11. Симбирцев А.С., Сахарова И.Я., Васильева Г.Ю., Баласанянц Г.С., Бокованов В.Е. Опыт применения бестима в комплексном лечении инфильтративных и деструктивных форм туберкулеза легких. *Российский семейный врач.* 2003; 3:17–9.

12. Barnes J.L., Warner J., Melrose W. Adaptive immunity in melioidosis: a possible role for T cells in determining outcome of infection with *Burkholderia pseudomallei*. *Clin. Immunol.* 2004; 113(1):22–8.

13. Ketheesan N., Barnes J.L., Ulett G.C. Demonstration of a cell-mediated immune response in melioidosis. *J. Infect. Dis.* 2002; 186(2):286–9.

References

1. Avrorova I.V., Zhukova S.I., Korsakova I.I., Khrapova N.P., Napalkova G.N. [*Burkholderia pseudomallei* surface biopolymers and their protective activity in experimental melioidosis]. *Infek. Patol.* 2010; 17(3):85–7.
2. Glants S. [Medical-Biological Statistics]. M.: Praktika; 1998. 459 p.
3. Zhukova S.I., Avrorova I.V., Proshina O.B., Rotov K.A., Khrapova N.P., Snatenkov E.A., Lomova L.V. [Method of immunoprophylaxis of experimental melioidosis using *Burkholderia pseudomallei* entrapped antigens]. RF Patent 2373955. 27.11.2009. Bull. 33.
4. Karaulov A.V. [Clinical-immunological efficacy of immunofan application in case of opportunistic infections]. *Lechashchii Vrach.* 2000; 4:52–5.
5. Karaulov A.V., Sokurenko S.I. [Immunofan: short term and remote results of curative treatment among the patients with chronic bronchitis]. *Medical Market.* 2000; 34:21–4.
6. Kukarkin N.Yu., Dolgushin I.I., Bordunovskiy V.N. [Bestim in the treatment of patients with chronic pyelonephritis]. In: [Immunity and Diseases: Translation of Theory into Practice]. M.; 2005. P. 90–1.
7. Lapach S.N., Chubenko A.V., Babich P.N. [Statistical Methods in Medical Biological Investigations using Excel Software]. Kiev: Morion; 2001. 408 p.
8. Lyubimov G.Yu., Zenkov N.G., Vol'sky N.N. [Chemoluminescence of peritoneal macrophages if exposed to macrophage-activation factor]. *Immunologiya.* 1992; 1:40–3.
9. Popova A.E. [Methodological recommendations for identification of edemagenic effect on white mice]. Volgograd; 1980. 18 p.
10. Sentsova T.B. [Modern immune-modulators]. *Otorinolaringologiya.* 2004; 3(5):16–8.
11. Simbirteev A.S., Sakharova I.Ya., Vasil'eva G.Yu., Balasanyants G.S., Bokovanov V.E. [Experience in usage of bestim in the complex treatment of infiltrative and destructive forms of pulmonary tuberculosis]. *Ros. Semeimyi Vrach.* 2003; 3:17–9.
12. Barnes J.L., Warner J., Melrose W. Adaptive immunity in melioidosis: a possible role for T cells in determining outcome of infection with *Burkholderia pseudomallei*. *Clin. Immunol.* 2004; 113(1):22–8.
13. Ketheesan N., Barnes J.L., Ulett G.C. Demonstration of a cell-mediated immune response in melioidosis. *J. Infect. Dis.* 2002; 186(2):286–9.

Authors:

Dem'yanova O.B., Zhukova S.I., Zankovich A.A., Khrapova N.P., Rotov K.A., Sintyurina N.N., Snatenkov E.A. Volgograd Research Anti-Plague Institute. 7, Golubinskaya St., Volgograd, 400131, Russian Federation. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Об авторах:

Демьянова О.Б., Жукова С.И., Занкович А.А., Храпова Н.П., Ротов К.А., Синтюрина Н.Н., Снатенков Е.А. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Поступила 08.04.14.