

Экспериментальная оценка иммуномодулирующей активности нового отечественного синтетического препарата «Тубосан»

Н. К. ЧЕРНИКОВА¹, В. В. МИХАЙЛОВ², С. В. БОРИСЕВИЧ¹

¹ 48 Центральный научно-исследовательский институт Минобороны России, Сергиев Посад

² Биофарм Право-Альфа, Сергиев Посад

Experimental Estimation of Immunomodulating Activity of Tubosan, a New Russian Synthetic Drug

N. K. CHERNIKOVA, V. V. MIKHAILOV, S. V. BORISEVICH

Central Research Institute No. 48, Ministry of Defense of the Russian Federation, Sergiev Posad

Biopharm Pravo-Alpha, Sergiev Posad

Новый отечественный синтетический иммуностимулятор «Тубосан», относящийся к группе пиримидиновых соединений сульфонового ряда, стимулирует гуморальный противовирусный иммунитет у мышей: увеличивает количество антителообразующих клеток в селезёнке мышей, иммунизированных эритроцитами барана, и титры вируснейтрализующих антител после иммунизации животных инактивированной и живой вакцинами ВЭЛ. Способность тубосана снижать реактогенность живой вакцины ВЭЛ открывает новые перспективы применения иммуностимуляторов данной группы в медицинской практике.

Ключевые слова: иммуностимулятор, иммунный ответ, реактогенность.

Tubosan, a new Russian immunostimulator is a derivative of sulfopyrimidine. It stimulated the humoral antiviral immunity in mice, provoked increasing the number of the antibody forming cells in the spleen of mice, immunized by sheep's erythrocytes, and increased the titers of the virus-neutralizing antibodies after immunization by inactivated and live vaccines VEE. The Tubosan ability to lower the reactivity of the live VEE vaccine provided new perspectives for using such immunomodulators in medical practice.

Key words: immunostimulator, immune response, reactivity.

Введение

В настоящее время наблюдается существенный прогресс в знаниях о структуре и функциях иммунной системы человека, что позволяет внедрить в практику здравоохранения информативные методы оценки и коррекции её состояния с помощью целого ряда иммуномодуляторов различной природы [1, 2].

В числе синтетических иммуностимуляторов, имеющих прикладное значение и применяемых для профилактики и лечения иммунодефицитов, в том числе при инфекционных заболеваниях, выделяют пиримидиновые соединения, среди которых более эффективными и менее токсичными являются сульфоновые производные пиримидина [3].

Характерный представитель этой группы соединений — препарат диуцифон, внедрённый в клиническую практику коллективом НИЛ иммунохимиотерапии лепры [4]. Разработаны методики успешной иммунокоррекции диуцифоном

вторичных иммунодефицитов, наблюдаемых при проказе, туберкулёзе, септическом шоке, гнойных хирургических заболеваниях, а также при аутоиммунных состояниях (системная склеродермия, ревматоидный артрит, красная волчанка). Такими же свойствами обладают и другие сульфоновые производные пиримидина. При изучении механизмов, лежащих в основе иммуномодулирующей активности данных соединений, установлено их влияние на синтез РНК и белка в лимфоцитах человека и животных, активацию пролиферации иммунокомпетентных клеток, увеличение абсолютного и относительного количества Т-лимфоцитов, соотношение фракций СД-8 и СД-4 Т-лимфоцитов, усиление бласттрансформации лимфоцитов, деятельность стволовых клеток костного мозга, фагоцитарную активность макрофагов [5].

В 2001 г. во ФГУП ГосНИИ «Кристалл» (г. Дзержинск) в результате направленного синтеза было получено новое соединение сульфопиримидинового ряда — метилдиокситетрагидропиримидинсульфон-изоникотиноилгидразид, выгодно отличающееся от предшественников своими физическими свойствами. В 2008 г. оно было заре-

© Коллектив авторов, 2014

Адрес для корреспонденции: 117105 Москва, Нагатинская ул, д. 3а. Редакция журнала Антибиотики и химиотерапия

Таблица 1. Оценка влияния тубосана на АОК в селезёнке мышей, иммунизированных эритроцитами барана

Иммунизирующая доза ЭБ, клеток/мышь	Номер серии препарата	Количество АОК, $X_{cp} \pm I_{95}$	Индекс стимуляции
3×10 ⁷	1	66,7±26,1	3,99
	2	66,5±14,2	3,98
	3	54,0±14,6	3,23
2×10 ⁸	Физ. раствор	16,7±5,1	—
	1	100,6±21,5	1,64
	2	68,5±17,8	1,11
	3	106,2±11,1	1,72
	Физ. раствор	61,5±11,7	—

Примечание. 1 — группы животных, которым вместо тубосана вводили физиологический раствор, служили в качестве контрольных; 2 — в каждой группе $n=10$; 3 — тубосан вводили внутривентриально в дозе 500 мкг/мышь; 4 — индекс стимуляции определяли как соотношение средней величины количества АОК в опытной и контрольной группах.

гистрировано ЗАО «Биофарм Право-Альфа» в Реестре лекарственных средств России под номером ЛСР-006593/08 под торговым названием Тубосан. Препарат заявлен как иммуностимулирующее средство, оказывающее влияние на все звенья иммунной системы, активный в отношении микобактерий туберкулёза, лепры и вируса герпеса [6].

Целью настоящей работы стало изучение иммуномодулирующей активности тубосана и оценка возможности применения соединений этого ряда в вакцинологии. Имеется достаточно данных об адьювантном действии иммуномодуляторов и использовании их для усиления иммунного ответа при вакцинации слабоиммуногенными противовирусными вакцинами или для устранения иммуносупрессии [1, 2, 7]. Возрастающее внимание к проблеме реактогенности вакцин и поствакцинальных осложнений, особенно в связи с изменением иммунного статуса населения [8], послужило основанием для изучения возможности снижения с помощью тубосана количества поствакцинальных реакций.

Материал и методы

Тубосан (метилдиокситетрагидропиримидин-сульфонизоникотиноилгидразид) представляет собой мелкодисперсный порошок светло-жёлтого цвета, легко растворимый в воде. Выпускается в капсулах.

Живые вакцины венесуэльского энцефаломиелиита лошадей (ВЭЛ) эмбриональные на основе штаммов 230 и 15 разработаны в ФГКУ НИЦ «33 ЦНИИИ» Минобороны России [9, 10]. Препараты ранее использовали для иммунизации групп риска, но в настоящее время не применяют в связи с повышенным уровнем реактогенности. Экспериментальный образец инактивированной вакцины ВЭЛ получен в ФГКУ НИЦ «48 ЦНИИИ» Минобороны России на основе очищенного методами дифференциального центрифугирования и ультрафильтрации инактивированного формалином вируса ВЭЛ (штамм 15), выращенного в РКЭ.

Мыши линии Balb/c массой 17–20 г приобретены в питомнике «Столбовая» Подольского района Московской области. Беспородные белые мыши массой 17–20 г и морские свинки массой 200–250 г выращены в питомнике ФГКУ НИЦ «33 ЦНИИИ» Минобороны России.

Препарат перед началом опытов растворяли в изотоническом растворе хлориде натрия и вводили животным внутривентриально или подкожно. Иммунизировали мышей и морских свинок подкожно. Дозы и схемы введения указаны в табл. 1–3.

Вирулицидную активность тубосана исследовали при воздействии препарата в концентрациях 10, 200 и 1000 мкг/мл на вирус ВЭЛ (штамм 15) *in vitro* в течение 1 ч при 37°С. Биологическую активность вируса определяли по цитопатическому действию в первично трипсинизированной культуре клеток куриных фибробластов (КФ).

Иммуностимулирующую активность оценивали по способности усиливать образование антителообразующих клеток (АОК) в селезёнке половозрелых белых мышей, иммунизированных эритроцитами барана (ЭБ), [11], а также по влиянию на образование вируснейтрализующих антител (ВНА) у животных в ответ на иммунизацию инактивированной и живой вакцинами ВЭЛ через 30 дней после иммунизации. Количество антителообразующих клеток (АОК) выявляли через 4 суток после введения эритроцитов методом локального гемолиза в геле. Титры ВНА определяли в реакции нейтрализации на культуре клеток КФ с 10–100 ЦПД₅₀ штамма 230 вируса ВЭЛ при пятикратном разведении сывороток.

Способность влиять на реактогенность вакцины ВЭЛ (штамм 15) оценивали по выраженности лихорадочной реакции у морских свинок в течение первых пяти суток после вакцинации дозой 3×10⁴ ЦПД₅₀.

Статистическую обработку результатов проводили согласно руководству по применению статистических методов в биологических исследованиях [12].

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследований при воздействии тубосана в диапазоне доз от 10 до 1000 мкг/мл на культуру штамма 15 вируса ВЭЛ *in vitro* снижения биологической активности вирусосодержащих проб выявлено не было. Величины ЦПД₅₀ в пробах до и после воздействия тубосана достоверно не отличались друг от друга, что свидетельствовало об отсутствии вирулицидных свойств данного лекарственного средства.

Иммуномодулирующую активность тубосана по способности влиять на образование АОК в селезёнке белых мышей линии Balb/c, иммунизированных эритроцитами барана, оценивали при внутривентриальном введении препарата сразу после иммунизации в дозе 500 мкг на особь. Результаты экспериментов представлены в табл. 1.

Из приведённых данных видно, что при иммунизации мышей 3×10⁷ ЭБ/мышь количество АОК в опытных группах достоверно выше, чем в контрольной, что позволяет сделать вывод о выраженной иммуностимулирующей активности

Таблица 2. Оценка влияния тубосана на образование ВНА при вакцинации белых мышей

Вакцина, прививочная доза	Разовая доза, мкг/мышь, схема и способ введения тубосана	Титр ВНА в сыворотках крови, Ме (I ₉₅)
Инактивированная вакцина ВЭЛ, 50 мкг белка	500, двукратно, за 1 сутки и 30 мин до вакцинации, подкожно	1:69 (1:37—1:84)
	Не вводили	1:30 (1:25—1:37)
Живая вакцина ВЭЛ, штамм 230, 60 ЦПД ₅₀	500, двукратно, за 1 сутки и 30 мин. до вакцинации, подкожно	1:506 (1:278—1:625)
	Не вводили	1:103 (1:56—1:125)

Примечание. В каждой группе $n=20$, исследовали 4 пула по 5 сывороток.

Таблица 3. Влияние тубосана на лихорадочную реакцию морских свинок, привитых живой вакциной ВЭЛ (штамм 15) в дозе 3×10^4 ЦПД₅₀

Схема введения препарата относительно вакцинации, разовая доза	Доля животных с лихорадкой, %, $X_{ср}$ (I ₉₅)	Время появления лихорадочной реакции, сутки, Ме (I ₉₅)	Продолжительность лихорадочной реакции, сутки, Ме (I ₉₅)	Выраженность температурной реакции во всей группе привитых животных, °С, Ме (I ₉₅)
Двукратно (за 24 и 0,5 ч), 50 мг/кг	90 (56—100)	3,0 (2,0—3,0)	4,0 (1,0—5,0)	39,8 (39,7—40,2)
Трёхкратно (за 24, 0,5 и через 24 ч), 50 мг/кг	70 (35—93)	3,0 (2,0—4,0)	3,0 (2,0—5,0)	39,6 (39,3—40,2)
Четырёхкратно (за 24, 0,5 через 24, 48 ч), 50 мг/кг	40 (12—41)	3,0 (1,0—4,0)	1,5 (1,0—2,0)	39,5 (39,1—39,8)
Не вводили	80 (41—98)	2,0 (1,0—4,0)	3,5 (1,0—5,0)	39,7 (39,5—40,1)

препарата. Увеличение иммунизирующей дозы до $2 \cdot 10^8$ ЭБ/мышь нивелирует различия в количестве АОК в опытных и контрольной группах.

При изучении влияния тубосана на иммуногенность инактивированной (в дозе 50 мкг белка) и живой на основе штамма 230 (в заведомо низкой дозе 60 ЦПД₅₀) вакцин ВЭЛ (табл. 2) было установлено, что предварительное введение препарата белым мышам приводило к повышению средних титров антител в 2 и 5 раз соответственно.

Анализируя результаты изучения влияния тубосана на клинические проявления вакцинального процесса (лихорадочную реакцию) у морских свинок, привитых живой вакциной ВЭЛ на основе штамма 15, представленные в таблице 3, можно прийти к заключению, что вакцинация животных на фоне четырёхкратного введения тубосана (за сутки, 0,5 суток до иммунизации и в течение двух суток после неё) приводит к развитию менее выраженной лихорадочной реакции по сравнению с ответом на иммунизацию без предварительного введения препарата в контрольной группе. Уменьшается не только количество лихорадящих особей с 80 до 40%, но и выраженность температурной реакции (замедляется время появления лихорадки и сокращается её продолжительность) в опытной группе животных.

В связи с отсутствием у тубосана прямого вирулицидного действия, подобный эффект, по-видимому, обусловлен его иммуностимулирующими свойствами. Вызванная стимуляция механизмов реакций иммунной системы позволила либо полностью избежать поствакцинальной реакции, либо существенно снизить её про-

явление. При этом важным моментом является тот факт, что средняя величина титров ВНА в опытной группе (1:256) была не ниже аналогичного показателя в контрольной группе (1:125).

Выявленные факты открывают перспективу нового аспекта применения тубосана и подобных ему соединений в практике вакцинологии.

Обобщая результаты воздействия тубосана на различные проявления иммунного процесса, можно высказать предположение, что его влияние на механизмы иммунитета в определённой мере зависит от силы антигенного раздражения и обусловлено изменением соотношения популяций Т-лимфоцитов: при слабом антигенном воздействии (см. табл. 1 и 2) происходит стимуляция Т-хелперов, приводящая к увеличению уровня гуморального иммунитета; при сильном антигенном влиянии, сопровождаемом клиническими проявлениями (поствакцинальной реакцией) (табл. 3), наоборот, происходит активация Т-супрессоров. Другими словами, тубосан устанавливает оптимальный баланс субпопуляций Т-лимфоцитов, обеспечивая поддержание гомеостаза макроорганизма.

Заключение

Проведённые исследования показали, что тубосан обладает выраженными иммуностимулирующими свойствами и может быть использован для стимуляции гуморального противовирусного иммунитета и уменьшения количества и выраженности поствакцинальных реакций. Целесообразно дальнейшее изучение препарата для внедрения его в практику вакцинологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Современные иммуномодуляторы: основные принципы их применения. Иммунология 2000; 5: 4—7.
2. Костинов М.П. Иммунокоррекция вакцинального процесса у лиц с нарушенным состоянием здоровья. М.: 2006; 172.
3. Воробьев А.А. Принципы по классификации и стратегии применения иммуномодуляторов в медицине. Журн микробиол 2002; 4: 93—98.
4. Инструкция по применению диуцифона. Утв. начальником Управления по внедрению новых лекарственных средств и медицинской техники МЗ СССР 26.03.1979.
5. Лесков В.П., Костюк Л.Е., Горлина Н.К. и др. Некоторые аспекты действия нового иммуностимулятора диуцифона. Иммунология 1982; 5: 34—36.
6. Реестр лекарственных средств России. М.: 2008.
7. Красильников И.В. Применение новых адьювантов в создании вакцин. Тезисы Всероссийской научно-практической конференции «Вакцинология 2008. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней». М.: 11—12 ноября 2008 г. М.: 2008; 68.
8. Медуницин Н.В. Вакцинология. М.: 2004; 446.
9. Андреев В.А., Воробьев А.А., Игонин А.М. и др. Живая сухая вакцина против венесуэльского энцефаломиелиита лошадей на основе аттенуированного штамма 230 вируса ВЭЛ. Авторское свидетельство № 35254 от 21.10.1966.
10. Лукин Е.П., Селваненко Г.М., Оссауленко В.Н. и др. Вакцина против венесуэльского энцефаломиелиита лошадей живая лиофилизированная на основе штамма 15 вируса ВЭЛ. Авторское свидетельство № 333313 от 01.09.1992.
11. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Иммунобиологические препараты). Ч 2. М.: 2012; 536.
12. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: 1962; 180.