

УДК 619:615.371.03

Пукач Ю.С., технолог
Виршич А.В., технолог
Герасименко В.И., технолог

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», г. Минск

ПРИМЕНЕНИЕ АДЬЮВАНТОВ И ИММУНОСТИМУЛЯТОРОВ В СОВРЕМЕННОМ ПРОИЗВОДСТВЕ ВИРУСНЫХ ВАКЦИН (ОБЗОР)

Резюме

В статье обобщены данные о значении адьювантов и иммуностимуляторов в производстве ветеринарных вакцин как наиболее существенных факторах регуляции иммунного процесса. Приведена классификация адьювантов и иммуностимуляторов, механизм действия и перспективы применения адьювантов в производстве вакцин, а также примеры основных иммунных препаратов.

Summary

The article summarizes data on the importance of adjuvants and immunostimulants in the production of veterinary vaccines as the most significant factors in the regulation of the immune process. The classification of adjuvants and immunostimulants, the mechanism of action and prospects for the use of adjuvants in the production of vaccines, as well as examples of basic immune preparations are given.

Поступила в редакцию 10.04.2018 г.

Проблема стимуляции иммуногенеза давно привлекает внимание иммунологов. В настоящее время учеными многих стран мира проведена большая работа по конструированию иммуностимуляторов и адьювантов, применяющихся совместно с вакцинами для лечения и профилактики болезней человека и животных. Более 100 лет ведется поиск веществ, которые влияли бы на образование антител и способствовали возникновению иммунных реакций. С этой целью постоянно разрабатываются новые более эффективные биологические, химические и физические иммуностимуляторы и адьюванты.

Адьюванты. Адьювант (от лат. «*adjuvare*» – усиливать) – соединение или комплекс веществ, используемое для усиления иммунного ответа при введении одновременно с иммуногеном. В отличие от иммуномодуляторов, они применяются для усиления специфического иммунного ответа (например, при вакцинации) чаще всего в здоровом организме, а не для нормализации нарушенных реакций иммунной системы при патологии.

В настоящее время известно большое

количество веществ, которые способны оказывать адьювантное действие на различные антигены. В качестве адьювантов используются убитые микроорганизмы (микобактерии, коринебактерии, нокардии и др.), органические вещества (бактериальные полисахариды и липополисахариды, лецитин, холестерин, ланолин, агар, глицерин, желатин, крахмал, пектины, протамины и др.), неорганические вещества (гидроксид алюминия, фосфат алюминия, хлорид кальция, фосфат кальция, гидроксид железа, аммониевокальциевые квасцы, минеральные масла и др.), синтетические вещества (нуклеотиды, полианионы и др.). Кроме простых адьювантов, используют сложные, представляющие собой смеси липидов с минеральными сорбентами, масел с липополисахаридами и эмульгаторами, микроорганизмов с маслами и другими веществами. Ниже приведена классификация адьювантов по физико-химическим и биологическим свойствам [7, 8].

Минеральные адьюванты. Широко изучены адьювантные свойства таких веществ неорганической природы, как гель гидрооксида алюминия (ГОА), фосфат алю-

миния, фосфат кальция, двуокись кремния и др [5]. Минеральные адъюванты позволяют обеспечить более длительный процесс поступления антигенов (депонирующий эффект). Недостаток этих адъювантов в том, что соли алюминия, вследствие образования мелких гранулам, в которых удерживается адсорбированный антиген, могут приводить к запуску воспалительных реакций.

Масляные адъюванты (эмульсии). Масляные адъюванты – тип адъювантов, в основе которых минеральные масла. Такие препараты представляют собой капельки воды с растворенным в них антигеном, находящиеся в масляной фазе. Этот тип эмульсии называется «вода в масле». В качестве масла применяется высокоочищенный жидкий парафин. Помимо масла обязательно должен присутствовать эмульгатор для стабилизации смеси. Противоположный тип эмульсии – «масло в воде» представляет собой микрокапли масла в воде, стабилизированные гидрофильными эмульгаторами. Этот тип эмульсии обеспечивает высокий уровень антиген-презентации и умеренное распознавание антигена, хорошо сочетается с липофильными иммуномодуляторами [3].

При эмульгировании эмульсии «вода в масле» в воде, содержащей гидрофильный эмульгатор, получится водно-масляно-водная эмульсия.

Эмульсии типа «вода-масло-вода» были предложены для решения проблемы вязкости, которая возникает при приготовлении эмульсии типа «вода в масле».

Положительный эффект вакцинации достигается тем, что минеральное масло не метаболизируется, благодаря чему капли эмульсии с находящимся внутри них антигеном удерживаются в месте введения длительное время [13].

Адъюванты природного происхождения. Адъювантным действием обладают многие природные соединения различного происхождения: белки, гликопротеиды, пептиды, полисахариды и др. Особенность этой группы адъювантов в том, что они не создают депо антигена в организме

и напрямую стимулируют выработку антител.

В последние годы учеными различных стран проведен цикл исследований по применению в качестве адъюванта хитозана и его производных в составе вакцин ветеринарного назначения. Ряд работ выполнен зарубежными учеными по включению модификаторов хитозана в качестве адъювантов в вакцины против листериоза, псевдомоноза, бруцеллеза, ящура, гриппа и других инфекций. Известен положительный опыт применения нанохитозана для повышения иммунного ответа при конструировании бруцеллезных вакцин.

Адъювантные свойства хитозана обусловлены его высокомолекулярной структурой, позволяющей удерживать антигены внутри полимера. Низкая скорость расщепления хитозана в тканях обуславливает длительное присутствие антигена в месте введения. Это связано с неспецифичностью ферментов организма к данному полимеру. Применение хитозана в качестве адъюванта позволяет получить иммунный ответ на вводимые антигены на уровне или выше иммунного ответа при использовании известных масляных и минеральных адъювантов, что свидетельствует о перспективности дальнейших исследований в этом направлении [6].

Синтетические адъюванты. Наиболее широко используются производные мурамилдипептида (MDP). Мурамилдипептид способствует выработке антител к синтетическим антигенам. В связи с его токсичностью усилия исследователей направлены на получение синтетических аналогов [5]. Примером таких аналогов является N-ацетил-мурамил-L-аланин-D-изоглютамин, обладающий сходной эффективностью. Его преимуществом является относительная нетоксичность и проявление адъювантного действия как в масляных, так и в водных растворах. Также применяется треонилловый аналог мурамилдипептида, который в смеси с эмульсией сквалена и неионным детергентом образует адъювант Синтекса. Наиболее активными аналогами, обладающими адъювант-

ными свойствами, являются треонил-МДП и 3'-п-пропил-МДП [3].

Поверхностно-активные адьюванты и искомые. Сапонин и искомые являются иммуномодуляторами, способными стимулировать Th 1 и Th 2 иммунные ответы. В составе вакцинных адьювантов в основном используются частично очищенные или определенные фракции QS 21 или ISCO-PREP сапонины. Сапонин вызывает повреждение тканей и тем самым способствует задержке антигена в месте инъекции [5].

Искомые представлены холестеролом, фосфолипидами и сапонинами. Это сферические структуры диаметром 35 нм, в которых амфифильные молекулы антигена и сапонины соединены через гидрофобную связь. В Швеции на фирме «Спикозайд» разрабатываются иммуностимулирующие комплексы ISCOM, представленные поверхностными белками вируса гриппа (гемагглютинин и нейраминидаза) и сапонином. Полученные комплексы обладают более высокой иммуногенностью, чем исходные белки. Поскольку ISCOM являются микрочастицами, они легко поглощаются макрофагами, где и происходит их процессинг и презентация [3].

Липосомы. Липосомы – микроскопические структуры, состоящие из нескольких концентрических липидных бимембранных структур, окруженных водой. Они представляют собой везикулы, которые способны инкапсулировать антиген и выступать в качестве средств его доставки [13]. Мембрана липосом имеет схожее строение с цитоплазматической мембраной клеток, благодаря этому антиген, находящийся внутри липосомы, оказывается защищенным от разрушительного действия активных сред организма, не имеет возможности взаимодействовать с компонентами крови. Липосомы осуществляют направленный транспорт антигена к клеткам ретикулоэндотелиальной системы. Многочисленные исследования доказали возможность использовать липосомы не только в качестве носителей, но и в качестве иммуномодулятора, обнаружив иммуномодулирующие свойства самих липосом.

При использовании липосом важное практическое значение имеет возможность применять высокотоксические вещества (яд гадюки) [3].

Очень сложен и пока еще не вполне изучен механизм действия адьювантов. Общей для всех адьювантов является способность в ближайшие часы после их введения активизировать белковый синтез. Адьюванты замедляют резорбцию антигенов из места введения, усиливая местную воспалительную реакцию, которая благоприятствует перемещению антигена к иммунологически компетентным клеткам плазматического ряда, в то же время эта реакция активизирует и усиливает размножение таких клеток. Адьюванты стимулируют фагоцитоз, а также усиливают синтез белка. По современным представлениям, антигенная информация, которая воспринимается макроорганизмами, передается затем антителообразующим клеткам в виде активного центра антигена (детерминанты), по видимому, связанного с РНК, под контролем которой в цитоплазме протекает белковый синтез [4].

Механизмы действия адьювантов характеризуются тремя основными типами:

- *депонирующий эффект* (создавая depot для антигена, адьюванты защищают его от быстрой деградации и пролонгируют иммунный ответ). К такого рода адьювантам относят соли алюминия (гидроокись алюминия – $Al(OH)_3$, фосфат алюминия – $AlPO_4$, алюминиевокалиевые квасцы – $KAl(SO_4)_2$), кальция (фосфорнокислый кальций – $Ca(PO_3)_2$), адьюванты типа Фрейнда – полный и неполный. В отличие от полного адьюванта Фрейнда, содержащего убитые туберкулезные микобактерии в минеральном масле, неполный адьювант Фрейнда содержит только минеральное масло в виде водно-масляной эмульсии.

В последние годы разработан ряд водно-масляных эмульсий, включаемых в качестве адьювантов в состав вакцин, которые также создают депонирующий эффект. Например, новый тип водно-масляной эмульсии SAF (Syntex adjuvant formulation) содержит в качестве иммуностимулирую-

щего соединения треонилмурамилдипептид и неионный блок полимерного сурфактанта poloxamer 401. В качестве метаболизируемого масла адъювант содержит сквален ($C_{30}H_{50}$), в качестве эмульгатора – полисорбат 80. Адъювант активирует как клеточный, так и гуморальный ответ к ряду антигенов. Другой прием депонирования антигена заключается в применении биодеградируемых микрокапсул, включающих молекулы искомого антигена и состоящих, например, из полимера (полилактид-когликолида) (PLG), цианоакрилата (поли(бутил-2-цианоакрилат) или наночастиц (полиметилметакрилата). Такие адъюванты проявляют способность активировать как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ.

- *Активация функций антигенпредставляющих клеток.* Антигены, например растворимые, сорбированные на микрочастицах адъюванта, более эффективно подвергаются эндоцитозу. Иначе говоря, становится более эффективной доставка антигена антигенпредставляющим клеткам и его деградация за счет активации процесса. В целях более эффективной доставки антигена его включают также в эмульсии, в иммуностимулирующие комплексы ISCOM (Immune-stimulating complexes) или в липосомы.

Также в ветеринарии в качестве адъювантов, стимулирующих иммунный ответ, применяют лизолецитин, глюканы, декстрансульфат, ацеманнан и др. Биодеградируемые микрочастицы, содержащие инкорпорированный антиген, обычно по размерам подобны бактериям и легко фагоцитируются.

Адъюванты на основе липосом содержат холестерин, димиристоил фосфатидилхолин, монофосфорил липид А, димиристоил фосфатидил глицерин, применяемые совместно с антигенами возбудителей малярии, гепатита, холеры, с дифтерийными и столбнячными анатоксинами. Разрабатываются адъюванты с применением липосом, адсорбированных на алюмокалиевых квасцах. Ряд разрабатываемых адъювантов содержит протеосомы и виросомы – мульти-

мерные белки бактериальных мембран и агрегаты трансмембранных вирусных белков.

- *Селективная активация Th1 или Th2 в результате костимуляции и усиления продукции цитокинов.* Обычно эффект достигается в результате взаимодействия рецепторов эффекторных клеток врожденного иммунитета с бактериальными антигенами, включаемыми в состав вакцинирующих препаратов. Так, например, туберкулезные микобактерии (*Mycobacterium tuberculosis*), включаемые в состав полного адъюванта Фрейнда, содержат мурамилдипептид (n – ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамин), способный активировать дендритные клетки и макрофаги через рецепторы NOD2 (Nucleotide-binding oligomerization domain 2). Комплексные микробные продукты, включаемые в состав адъювантов, могут активировать также антигенпредставляющие клетки через PRR-рецепторы типа TLR (Toll-like receptors). Это сопровождается продукцией ИЛ-1 и ИЛ-12 — цитокинов, усиливающих T-клеточный ответ (Th1 или Th2 в зависимости от используемых микробных продуктов) и фокусирующих ответ на формировании реакций адаптивного иммунитета. Обычно в качестве TLR-активирующих агентов используют липополисахариды или их продукты. Такие препараты обладают иммуностимулирующей активностью, действующей неспецифической резистентности к бактериальным инфекциям, активируют продукцию антител (Th2), не влияют на клеточный ответ и могут отменять толерантность. Стимулирующей активностью обладают коринебактерии (*Corynebacterium parvum*), которые при использовании их в качестве адъюванта усиливают антибактериальную и противоопухолевую активность вакцин, активируют Th1. Убитые микробы – возбудители коклюша (*Bordetella pertussis*) – активируют Th2, макрофаги и селективную продукцию IgE, усиливают иммунологическую память [1].

При использовании адъювантов для создания средств активной профилактики необходимо знать, что адъюванты не могут

быть универсальными. В связи с этим следует учитывать, что определенный адъювант, способный стимулировать иммунитет, создаваемый одним антигеном, может оказаться инертным в отношении другого. При повышенных дозах адъюванта может возникнуть иммуносупрессивное действие. При однократном введении антигена одновременно с адъювантами гуморальный иммунитет увеличивается в несколько раз [8].

Наиболее важным достоинством любых адъювантов является то, что введение иммунобиологических препаратов с адъювантом приводит к созданию более напряженного и продолжительного иммунитета, снижает токсичность **вакцины** и создает так называемое депо антигенов в организме вакцинированного.

Не существует специфических требований контроля безопасности адъювантом: проводятся острые и хронические тесты на лабораторных животных. **Адъюванты** должны быть свободными от балластных веществ, не содержать антигенов, сходных с антигенами хозяина, не обладать онкогенными, аллергенными и токсическими свойствами, легко метаболизироваться в организме.

Применение адъювантов позволяет интенсифицировать иммунный ответ, снизить дозу вводимого антигена, уменьшить кратность его введений, пролонгировать периоды между повторными инъекциями антигена за счет усиления иммунологической памяти [1].

Иммуностимуляторы. Иммуностимуляторами называются вещества, которые оказывают непосредственное влияние на иммунную систему организма, усиливая иммунитет. Усиление иммунитета с помощью иммуностимуляторов не безгранично, а возможно лишь до уровня нормы.

Иммуностимуляторы применяются для усиления защитных сил организма при различных заболеваниях (хронические вялотекущие инфекции, опухоли, состояния иммунодефицита). Сами по себе они не лечат болезнь, а усиливают ответ иммунной системы на воздействие патогенного агента. Действие иммуномодуляторов

продолжается длительное время и не ограничивается периодом болезни [9].

Большинство современных эффективных иммуностимуляторов представляет собой вещества полипептидной, реже белковой природы либо является комплексами органических соединений, которые при пероральном введении деградируют в пищеварительном канале или печени, поэтому должны вводиться парентерально. Одни из них создают в организме ситуацию, сходную с инфекционным процессом, и провоцируют иммунные реакции, другие непосредственно активируют функцию иммунокомпетентных органов, третьи выполняют роль мессенджеров либо сами включаются в иммунные процессы. В любом случае необходимо иметь в виду, что добиться больших успехов с помощью одних иммуностимуляторов невозможно. Лучшие результаты получаются при их сочетании со специфическими средствами, другими биологически активными веществами, такими как витамины, микроэлементы, пробиотики и при рациональном кормлении [3]. Кроме того, А.Г. Шахов в своих работах показывает хорошие результаты при применении иммуностимулирующих препаратов в последний период беременности для профилактики инфекционных болезней новорожденных.

Иммуностимуляторы по основным функциональным признакам подразделяются на препараты, стимулирующие преимущественно неспецифическую резистентность организма (продигиозан, метилурацил, пентоксил, нуклеинат натрия); стимулирующие клеточный иммунитет (тималин, тактивин, тимоптин, тимоген, молграмостин, леакадин, тимостимулин, тимувокал, тимомодулин); стимулирующие гуморальные иммунные реакции (В-система иммунитета) иммунитета (миелопид, спленин) [11].

Иммуностимуляторы в зависимости от их состава, происхождения можно разделить на следующие виды:

- природные препараты – нуклеинат натрия, работан, гамапрен, сальмозан, фостпренил, достин;

- синтетические – гликопин, иммунофан, ронколейкин, анандин, камедон, максидин;

- комплексные вещества – кипорон, мастим-OL, гамавит.

Пробиотики, содержащие бифидо- и лактобактерии, также можно отнести к иммуностимуляторам. Их применяют при аллергиях, аутоиммунных болезнях.

Ниже приведены примеры основных иммунных препаратов.

Нуклеопептид, гамавит, мастим по своей сути, составу являются биостимуляторами, которые повышают устойчивость организма к вирусным, инфекционным заболеваниям. При этом нуклеопептид является экстрактом селезенки крупного рогатого скота, активизирует антитоксичную функцию печени животных.

Галавет, гамапрен, фоспренил снижают риск возникновения аутоиммунной реакции, уменьшают интоксикацию организма, создают условия для уничтожения вируса.

Ронколейкин применяется только в крайних случаях при реальной угрозе жизни самому животному, поскольку этот препарат оказывает наиболее сильное воздействие на иммунитет, проводя «шоковую терапию».

Неоферон, кинорон представляют собой интерфероны, которые подавляют вирусы, а также опухолевые клетки.

Глобфен – иммуноглобулин, который применяется при необходимости подавить размножение вирусов и микробов.

Трифузол – препарат нового поколения, иммуномодулятор, защищающий сердце и печень. Также это средство обладает ранозаживляющим, противовоспалительным, антиоксидантным действием. Эффективен для профилактики, лечения различных заболеваний крупного и мелкого рогатого скота, лошадей, свиней, кошек, собак, птицы в комплексе с другими лекарствами.

Метилурацил 0,5 Укрветбиофарм применяется для активизации обменных процессов, лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта, заживления ран, восстановления тканей сельскохозяйственных

животных и домашних питомцев.

АСД-2 восстанавливает гормональный фон, активизирует ЦНС, вегетативную нервную систему, нормализует деятельность пищеварительной системы, повышает сопротивляемость организма. Фракция АСД-2 представляет собой жидкость темно-красного или желтого цвета для перорального и наружного применения.

Главной проблемой иммунной коррекции организма животного является диагностика иммунодефицита и в последующем обоснованное применение того или иного иммуностимулятора. Иммуностимуляторы, предназначенные для защиты организма и оптимизации его состояния, должны отвечать следующим критериям:

- иметь широкий спектр иммуностимулирующего действия и минимальную токсичность;

- отсутствие остатков препарата и его метаболитов в продуктах животноводства;

- отсутствие способности накапливаться в окружающей среде [10].

В настоящее время особое внимание уделяется экологически безвредным препаратам – иммуностимуляторам. Особенностью иммуностимулирующих препаратов является их высокая биологическая активность, направленная на активизацию иммунитета и обменных процессов у животных, в результате чего организм животного самостоятельно избавляется от паразитов. Кроме этого, иммуностимуляторы выгодно отличаются от антгельминтиков тем, что не оказывают побочного действия, не накапливаются в органах и тканях животного, не вызывают привыкания со стороны паразитов и не загрязняют окружающую среду [2, 12].

Таким образом, правильное применение иммуностимулирующих препаратов не только безопасно, но представляет собой весьма эффективный способ профилактики и лечения заболеваний животных и поддержания их резистентности на высоком уровне.

Многочисленные запросы клинической практики, обусловленные неблагопо-

лучием окружающей среды, ростом иммунодефицитов и заболеваемости человека и животных, индуцировали процессы активного поиска и создания иммуномодулирующих средств стимулирующего типа с целью активации нарушенных функций системы иммунитета и их нормализации.

На сегодняшний день имеется большой выбор новых коммерческих готовых адъювантных и иммуностимулирующих продуктов, которые также находятся на стадии разработки и испытаний, предназначен-

ных для разных видов животных, направленных на инициацию различных типов иммунного ответа, сочетающих в себе различные уровни показателей эффективности и безопасности. Поэтому исследования по включению различных типов адъювантов в состав инактивированных вакцин, а также по применению иммуностимуляторов весьма актуальны, их проводят большинство европейских фирм, занимающихся производством биопрепаратов для ветеринарии.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Адъюванты [Электронный ресурс] / Все о животноводстве. – Режим доступа: <http://worldgonesor.ru/veterinarnaya-immunologiya/2469-adyuvanty.html> / – Дата доступа: 03.04.2018.
- 2 Иммунитет и его коррекция в ветеринарной медицине / П.А. Красочко [и др.]; под общей ред. П.А. Красочко. – Смоленск, 2001. – 322 с.
- 3 Исаенко, Е.Ю. Адъюванты в современной вакцинологии / Е.Ю. Исаенко [и др.] // *Аннали Мечниковського інституту*. – 2013. – № 4. – С. 5–21.
- 4 Казаков, Н.А. Усиление поствакцинального иммунитета против анаплазмоза рогатого скота при помощи адъювантов / Н.А. Казаков, Н.Ш. Камолов // *Ветеринарная патология*. – 2008. – № 4 (27). – С. 121–123.
- 5 Кононов, А.В. Антигенные свойства вакцины против коронавирусной инфекции КРС с разными адъювантами / А.В. Кононов [и др.] // *Труды Федерального центра охраны здоровья животных*. – 2009. – Т. 7. – С. 50–54.
- 6 Крыжановская, Е.В. Адсорбционные и адъювантные свойства хитозана / Е.В. Крыжановская [и др.] // *Веткорм*. – 2008. – №4. – С. 34–35.
- 7 Медуницын, Н.В. Вакцинология / Н.В. Медуницын // Изд. 2-е, перераб. и доп. – М.: Триада-Х, 2004. – 448 с.
- 8 Михалишин, В.В. Адъюванты и их использование / В.В. Михалишин, Н.С. Мамков // *Тр. Федерального центра охраны здоровья животных*. – Владимир, 2008. – Т. 6. – С. 340–371.
- 9 Мищук М.Е. Современные иммуномодуляторы и их применение в ветеринарной медицине / М.Е. Мищук, В.В. Коснырев, Н.Г. Курочкина // *Молодежь и наука*. – 2017. – №4.1 – С. 47.
- 10 Петрянкин, Ф.П. Иммунотропные препараты для лечения и профилактики болезней животных / Ф.П. Петрянкин // *Ветеринарная патология*. – 2009. – № 2. – С. 98–105.
- 11 Хаитов, Р.М. Экологическая иммунология / Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин, Х.И. Истамов // М.: Изд-во ВНИРО, 1995. – 219 с.
- 12 Якубовский, М.В. Иммунитет при гельминтозах животных / М.В. Якубовский // *Известия академии аграрных наук Республики Беларусь*. – 1997. – № 4. – С. 74–77.
- 13 Nathalie Garçon. Vaccine adjuvants / Nathalie Garçon, Geert Leroux-Roels, Wen-Fang Cheng // *Perspectives in Vaccinology*. – 2011. – Vol. 1, № 1. – P. 89 – 113.

наша продукция

