

Н.В.Лизогуб, Г.Л.Осипова, Т.П.Оспельникова, В.Б.Гервазиева

Влияние поликомпонентной вакцины иммуновак ВП-4 на систему врожденного иммунитета у больных atopической бронхиальной астмой

ФГУ НИИ пульмонологии Росздрава;
ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи РАМН;
ГУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова РАМН

N.V.Lizogub, G.L.Osipova, T.P.Ospelnikova, V.B.Gervazieva

The influence of polyvalent vaccine Immunovac VP-4 on the inherent immunity in patients with atopic asthma

Summary

All the patients with mild to moderate atopic asthma (AA) involved to this study were found to have significant deficiency of interferon production. To stimulate the non-specific immunity we vaccinated 19 AA patients with polyvalent bacterial vaccine Immunovac VP-4. Other 14 patients were included in the control group. Statistical analysis was performed for 12 study group patients and 8 controls which had been observed for at least 6 months. Vaccinated patients tended to increase in lymphocyte alpha-interferon (INF) production and showed a reliable growth of lymphocyte gamma-INF production and serum gamma-INF level. They have reduced the rate of acute respiratory viral infection episodes and the rate and severity of AA exacerbations during epidemic outbreaks of viral respiratory infections.

Резюме

У всех обследованных больных с atopической бронхиальной астмой (АБА) средней и легкой степени тяжести был выявлен выраженный дефицит интерфероногенеза.

С целью стимуляции неспецифического иммунитета 19 больных АБА были вакцинированы поликомпонентной бактериальной вакциной иммуновак ВП-4. Контрольную группу составили 14 пациентов. Статистически был обработан материал 12 пациентов из основной группы и 8 пациентов из контрольной группы, у которых период наблюдения составил не менее 0,5 года. У вакцинированных пациентов в динамике была выявлена тенденция к повышению продукции альфа-интерферона (ИФН) лимфоцитами, достоверное повышение продукции гамма-ИФН лимфоцитами, уровня сывороточного гамма-ИФН, что повлияло на уменьшение частоты ОРВИ, а также на снижение частоты и тяжести обострений БА в период эпидемий вирусных инфекций.

Введение

Известно, что бронхиальная астма (БА) является генетически детерминированным заболеванием и обострения заболевания, как правило, связаны с действием различных факторов.

Так, в работах *S.D.Message, S.L.Johnston* [1, 2] показано, что вирусная инфекция является одним из главных триггеров в формировании одышки у младенцев и обострений БА как у детей, так и у взрослых.

Введение техники молекулярной биологии ПЦР (RT-PCR) дополнительно к культуральным и серологическим методам позволило определить связь вирусной инфекции с обострениями БА более чем в 80 % случаев у детей и в 50–55 % случаев у взрослых [3].

Основными факторами защиты организма человека от вирусной инфекции являются тканевые барьеры, элементы неспецифического и специфического иммунитета. При БА изначально страдают два последних звена.

В норме при первичном вирусном инфицировании развивается каскад следующих реакций. Интерфероны (ИНФ) 1-го типа (альфа, бета, омега, тета),

продуцируемые эпителиальными клетками и лейкоцитами, достигают пика на 3 день после инфицирования, оказывают прямое противовирусное действие и приводят к активации НК-клеток. Повышению активности НК-клеток способствует также IL-2, высвобождаемый дендритными клетками после захвата ими антигена. НК-клетки, достигающие пика на 4-й день, опознают и разрушают вирусинфицированные клетки, а также высвобождают цитокины, включая гамма-ИФН, которые активируют дополнительные воспалительные клетки в дыхательных путях, в частности, макрофаги [2]. Гамма-ИФН, кроме того, способствует развитию специфического иммунного ответа Th1 типа, что приводит к продукции противовирусных цитокинов, активации цитотоксических CD8+ лимфоцитов. При БА снижение интерферон-продуцирующей способности лейкоцитов, недостаток необходимых для вирусного клиренса цитокинов Th1 приводит к персистенции вирусных стимулов и усилению воспаления, которым характеризуется астма [4, 5].

В этой связи представляют большой интерес препараты, способствующие стимуляции врожденного иммунитета. К таким препаратам относятся иммуномодуляторы микробного происхождения (ИМП).

Установлено, что система врожденного иммунитета сфокусирована на нескольких высоко консервативных структурах микроорганизмов — бактериальных липополисахаридах, липотейхоевых кислотах, пептидогликанах, маннанах, бактериальных ДНК, двуспиральных РНК, глюканах, которые взаимодействуют с соответствующими им рецепторами врожденной иммунной системы. ИМП в своем составе содержат эти консервативные структуры микроорганизмов, поэтому они могут оказывать влияние на клетки врожденной иммунной системы: мононуклеарные фагоциты, естественные киллеры, полиморфноядерные лейкоциты, эпителиальные и дендритные клетки. Это влияние осуществляется, преимущественно, через сигнальные рецепторы, к которым относят так называемые *Toll-like* (TLR) рецепторы и NOD1-, NOD2-рецепторы. Результатом взаимодействия ИМП с соответствующими рецепторами является активация транскрипционного фактора NF-каппа-бета и индукция экспрессии большого количества генов, в частности, генов провоспалительных цитокинов. Иницируется синтез IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, ФНО-альфа, гамма-ИНФ, ГМКСФ, что повышает защитный барьер организма. Усиление активности Т-эффекторов и В-клеток по временным и количественным параметрам скорее свидетельствует об активации уже имеющихся зрелых антиген-специфических лимфоцитов, чем о формировании новых клонов [6]. К отечественным ИМП относится поликомпонентная вакцина иммунонак ВП-4, разработанная в ГУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова.

Целью нашей работы было оценить терапевтический эффект вакцины, интерферон-продуцирующую способность лейкоцитов и уровень IL-4, сывороточного гамма-ИНФ у больных с atopической БА легкой и средней степени тяжести на фоне вакцинации.

Материалы и методы

Пациенты

В нашем исследовании наблюдались 33 пациента с БА легкой и средней степени тяжести. После рандомизации основную группу, получающую иммунонак ВП-4, составили 19 пациентов, контрольную группу — 14 пациентов.

В данной статье проводится предварительная оценка результатов вакцинотерапии, поэтому материал 12 пациентов из основной группы (6 мужчин и 6 женщин) и 8 пациентов из контрольной группы (3 мужчины и 5 женщин), у которых период наблюдения составил не менее 0,5 года, был обработан статистически. Возраст пациентов в исследуемых группах составил 37 ± 20 лет.

В основной группе 4 человека получали ингаляционные глюкокортикостероиды (иГКС) в дозе 200–500 мкг / сут. (в пересчете на беклометазона дипропионат), 4 человека — кромоны и 4 человека только β_2 -агонисты по требованию. В контрольной группе 5 человек получали иГКС 200–600 мкг / сут. (в пересчете на беклометазона дипропионат), 1 пациент получал беклометазона дипропионат в дозе 1 000 мкг / сут. и 2 пациента β_2 -агонисты по требованию. Вакцинация проводилась пациентам только в фазе ремиссии.

Эффективность лечения оценивалась по частоте ОРВИ и частоте тяжести обострений БА за 0,5 года наблюдения, объему базисной лекарственной терапии.

Поликомпонентная вакцина иммунонак ВП-4

Вакцина изготовлена из антигенных комплексов *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*. В препарате тестированы пептидогликаны, поверхностные антигены указанных микроорганизмов, липополисахариды грам-отрицательных бактерий, тейхоевая кислота стафилококка [7], что предполагает действие ВП-4 на клетки врожденного иммунитета, преимущественно, через TLR-2, TLR-4, NOD-1, NOD-2. Вакцину вводили трехкратно путем закапывания в нос и пяти-, восьмикратно подкожно.

Вакцина была предоставлена профессором Н.Б.Егоровой из НИИВС им. И.И.Мечникова.

Методы обследования

1. Исследование содержания общего и специфических IgE в сыворотке крови, которое определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) в лаборатории алергодиагностики ГУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова РАМН.
2. Исследование микрометодом в цельной гепаринизированной крови показателей интерферонового статуса: циркулирующего интерферона; уровня продукции альфа-ИНФ лейкоцитами при стимуляции их вирусом болезни Ньюкасла по общепринятой методике; уровня продукции гамма-ИНФ лимфоцитами при индукции их митогеном — ФГА (*Disco*) в дозе 10 мкг / мл; уровня продукции спонтанного ИНФ *in vitro*. Титрование интерферона проводили в диплоидной культуре фибробластов человека М-19. В качестве тест-вируса использовали вирус энцефаломиокардита мышей. За единицу активности принимали величину обратную его разведению и обеспечивающую защиту 50 % клеток монослоя от цитопатогенного действия тест-вируса [8]. Постановку реакций осуществляли в лаборатории индукторов ИНФ ГУ НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи РАМН.
3. Исследование уровня сывороточного гамма-ИНФ и IL-4 методом ИФА с использованием тест-систем *ProCon* (г. Санкт-Петербург) — в выше названной лаборатории.

4. Исследование функции внешнего дыхания (ФВД) проводили компьютерным спироанализатором (*Pneumoscreen, Erich Jaeger*, Германия). В качестве бронхолитика использовали селективный β_2 -агонист. Регистрировали следующие показатели: FEV₁, PEF, коэффициент прироста FEV₁ после приема β_2 -агониста.

Обследование проводилось до лечения и через 2,6 мес. после лечения.

Статистический анализ

Данные представлены как средние величины. Достоверность различий средних величин определяли с помощью t-критерия Стьюдента. Для оценки различий заболеваемости в основной и контрольной группах использовали критерий Уайта.

Результаты

У всех пациентов подтвердили аллергию на основании кожных прик-тестов, исследования специфических IgE, общего сывороточного IgE.

У всех пациентов основной и контрольной групп отметили значительное снижение интерферон-продуцирующей способности лейкоцитов: снижение продукции альфа-ИФН лейкоцитами соответствовало 1–3 степени недостаточности; снижение продукции гамма-ИФН соответствовало 2, 4-й степени недостаточности.

У 8 из 12 пациентов основной группы интерферогенез оценивали через 2 мес. после вакцинации и выявили тенденцию к повышению продукции альфа-ИФН лейкоцитами с $102,5 \pm 21,86$ Ед / мл до $405 \pm 142,7$ Ед / мл.

При динамическом исследовании через 0,5 года после вакцинации продукция лимфоцитами гамма-ИФН ($n = 12$) возросла с $11,92 \pm 1,95$ Ед / мл до $34,67 \pm 10,26$ Ед / мл (рисунок), что было статистически достоверно ($p = 0,04$).

Через 0,5 года после вакцинации в основной группе статистически достоверных изменений уровней сывороточного, спонтанного ИФН, продукции лейкоцитами альфа-ИФН, общего IgE не выявлено (табл. 1). У 8 из 12 пациентов основной группы оценивали уровень IL-4 до и через 0,5 года после вакцинации. До вакцинации уровень IL-4 составил $8,67 \pm 3,77$ пкг / мл, после вакцинации — $4,19 \pm 1,18$ пкг / мл (изменения статистически недостоверны).

Уровень сывороточного гамма-ИФН ($n = 8$) через 0,5 года после вакцинации статистически досто-

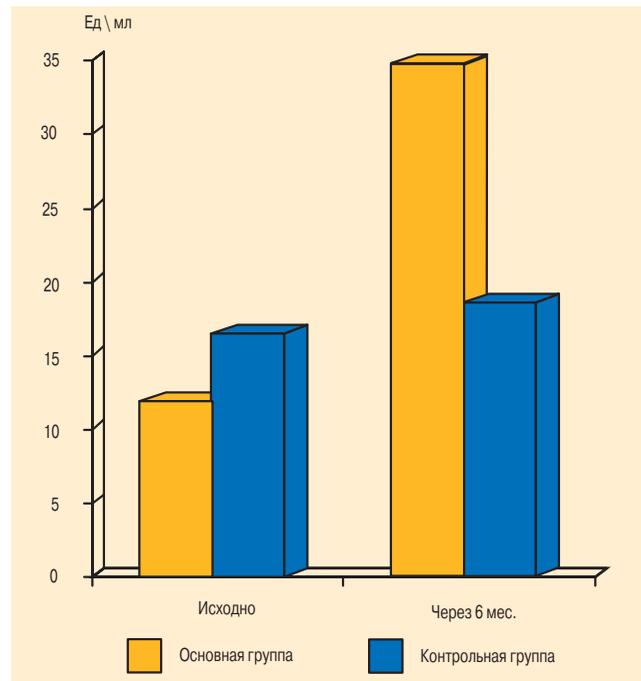


Рисунок. Продукция гамма-ИФН лимфоцитами

верно возрос с $16,76 \pm 4,08$ пкг / мл до $40,77 \pm 6,38$ пкг / мл.

В контрольной группе ($n = 8$) через 0,5 года наблюдения выявили только статистически достоверное снижение уровня сывороточного ИФН. Значимых изменений интерферон-продуцирующей способности лейкоцитов в этой группе не выявлено (табл. 2). В контрольной группе оценивались только исходные уровни сывороточных гамма-ИФН и IL-4. Они составили $46,38 \pm 5,28$ пкг / мл и $3,01$ пкг / мл, соответственно.

Корреляции между показателями ФВД и показателями интерферогенеза не отмечено. При оценке с помощью критерия Уайта выявлена меньшая заболеваемость ОРВИ и меньшая частота обострений БА в группе вакцинированных пациентов по сравнению с контрольной группой. Так, в основной группе в течение 0,5 года после вакцинации у 58 % пациентов не было ОРВИ, у 75 % не было обострений БА. В контрольной группе ОРВИ отсутствовали только у 12,5 % пациентов, обострений астмы не было у 25 % пациентов (табл. 3 и 4).

Обострения БА у 3 пациентов основной группы были легкой или средней степени тяжести, не требовали госпитализации. У 3 вакцинированных пациентов ввиду длительного отсутствия симптомов астмы

Таблица 1
Показатели интерферонового статуса, общего IgE у больных БА, вакцинированных ВП-4 ($n = 12$)

	Сывороточный ИФН, Ед / мл	Альфа-ИФН, Ед / мл	Гамма-ИФН, Ед / мл	Спонтанный ИФН, Ед / мл	Общий IgE, кЕ / л
Исходно	$7,16 \pm 1,95$	$108,3 \pm 18,82$	$11,92 \pm 1,95$	$1,08 \pm 0,08$	$437 \pm 158,7$
Через 6 мес. после вакцинации	$7,75 \pm 2,36$	$163,3 \pm 34,63$	$34,67 \pm 10,3^*$	$1,25 \pm 0,13$	$485,8 \pm 167,5$

Примечание: * — $p < 0,05$.

Таблица 2

Показатели интерферонового статуса, общего IgE у больных контрольной группы (n = 8)

	Сывороточный ИФН, Ед / мл	Альфа-ИФН, Ед / мл	Гамма-ИФН, Ед / мл	Спонтанный ИФН, Ед / мл	Общий IgE, кЕ / л
Исходно	11,5 ± 3,39	122,5 ± 32,17	16,5 ± 3,66	1,12 ± 0,22	189,7 ± 67,48
Через 6 мес. наблюдения	1,5 ± 0,62*	135 ± 41,19	18,5 ± 2,26	0,87 ± 0,47	545,7 ± 368,1

Примечание: * — $p < 0,05$.

кромоны были отменены. У 2 из 19 пациентов вакцинация ВП-4 была прекращена из-за обострения БА.

Обсуждение и выводы

Анализируя полученные данные, мы отметили, что у всех больных БА легкой и средней степени тяжести в основной и контрольной группах сначала наблюдалось значительное снижение интерферон-продуцирующей способности лейкоцитов. Такой дефицит интерфероногенеза, на наш взгляд, обуславливает сильную уязвимость этих пациентов по отношению к вирусным инфекциям и приводит к частым и затяжным обострениям БА на их фоне. В этой связи представляется актуальным использование иммунокорригирующей терапии с целью профилактики частых ОРВИ, развития бронхообструктивных процессов. В качестве возможных иммуномодуляторов у больных БА в последнее время рассматриваются ИМП.

В нашей работе был использован отечественный ИМП — поликомпонентная вакцина иммуновак ВП-4.

В отечественной литературе описано корригирующее влияние ВП-4 на численность и функциональную активность различных субпопуляций Т-лимфоцитов. После вакцинотерапии увеличивалось относительное количество CD3+ лимфоцитов (общие Т-лимфоциты), повышалось абсолютное количество CD4+ (Т-хелперов) и CD8+ (цитотоксических) лимфоцитов [9]. В другой работе, кроме того, было выявлено повышение уровня субпопуляции CD16 (натуральные киллеры) [10]. После вакцинации отмечалась тенденция к увеличению concentra-

ций IgA и IgM в сыворотке крови. Отмечено повышение продукции лейкоцитами альфа- и гамма-ИФН непосредственно после завершения курса лечения ВП-4 [9, 11].

Мы впервые провели исследование интерфероногенеза у вакцинированных больных в динамике. Через 2 мес. после вакцинации у 75 % пациентов основной группы выявили тенденцию к повышению продукции лейкоцитами альфа-ИФН, а через 0,5 года у всех вакцинированных пациентов статистически достоверно возросла продукция лимфоцитами гамма-ИФН.

Интерферон-продуцирующая способность лейкоцитов пациентов контрольной группы значимо не изменялась. Таким образом, мы отметили возрастание эффекторного потенциала клеток врожденного иммунитета у вакцинированных больных, что проявилось увеличением продукции ИФН. Это, в свою очередь, повлияло на антивирусный потенциал пациентов.

В группе пациентов, вакцинированных ВП-4, получено достоверное снижение частоты заболеваемости ОРВИ и снижение частоты обострений БА по сравнению с контрольной группой.

Обострения БА на фоне вакцинации отмечались у 2 наших пациентов. Подобные обострения у больных БА при лечении ИМП ранее описаны в литературе и связываются с обострением персистирующей вирусной инфекции у таких пациентов [12].

Феномен персистирующей вирусной инфекции у пациентов с БА остается мало изученным и недостаточно клинически озвучен. Исследования в этой области позволили бы лучше понять механизмы ви-

Таблица 3

Оценка частоты обострений БА на фоне ОРВИ у пациентов основной и контрольной группы через 0,5 года наблюдения

	Число пациентов			
	всего	без обострений / %	с 1–2 обострениями / %	с 3–4 обострениями / %
Вакцинированные пациенты	12	9 / 74,9	3 / 24,9	0
Контрольная группа	8	2 / 25	6 / 75	0

Таблица 4

Оценка частоты ОРВИ у больных БА через 0,5 года наблюдения

	Число пациентов			
	всего	без обострений / %	с 1–2 обострениями / %	с 3–4 обострениями / %
Вакцинированные пациенты	12	7 / 58,3	4 / 33,3	1 / 8,3
Контрольная группа	8	1 / 12,5	5 / 62,5	2 / 25

русиндуцированных обострений БА, более целенаправленно проводить комплексное лечение с применением иммуномодуляторов у больных БА.

Литература

1. *Message S.D., Johnston S.L.* Viruses in asthma. *Br. Med. Bull.* 2002; 61: 29–43.
2. *Message S.D., Johnston S.L.* Host defense function of the airway epithelium in health and disease: clinical background. *J. Leukocyte Biol.* 2004; 75: 5–17.
3. *Jacoby D.B.* Virus-induced asthma attacks. *J: A.M.A.* 2002; 287 (6): 755–761.
4. *Brooks G.D. et al.* Rhinovirus-induced interferon-gamma and airway responsiveness in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003; 168: 1091–1094.
5. *Papadopoulos N.G., Johnston S.L. et al.* A defective type 1 response to rhinovirus in atopic asthma. *Thorax* 2002; 57: 328–332.
6. *Козлов И.Г.* Юбилейный сборник научных статей Лекарственные воздействия через рецепторы врожденного иммунитета. Ликопид в комплексном лечении и профилактике иммунодефицитных состояний. М.; 2005. 6–18.
7. *Степушина М.А.* Эффект поликомпонентной бактериальной вакцины ВП-4 при бронхиальной астме у детей: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М.; 1996.
8. *Григорян С.С. и др.* Оценка интерферонового статуса по пробам цельной крови. *Вопр. вирусол.* 1988; 4: 433–436.
9. *Антонова Л.П., Маркова Т.П., Курбатова Е.А.* Применение ВП-4 комбинированным назально-подкожным методом в лечении больных бронхиальной астмой. *Журн. микробиол.* 2004; 6: 36–40.
10. *Егорова Н.Б. и др.* Итоги экспериментального и клинического изучения поликомпонентной вакцины из антигенов условно патогенных микроорганизмов. *Журн. микробиол.* 1997; 6: 96–101.
11. *Осипова Г.Л.* Оптимизация патогенетической терапии бронхиальной астмы и других аллергических заболеваний: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М.; 2003.
12. *Бербенцова Э.П.* Пособие по пульмонологии. М.; 1998.

Поступила 23.12.05

© Коллектив авторов, 2006

УДК 616.248-085.275.2-07:616-092-07