

На правах рукописи



Филиппенко Анна Владимировна

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ
ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ ДЛЯ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ
СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ХОЛЕРЫ**

3.2.7. Иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Новосибирск – 2023

Работа выполнена в Федеральном казенном учреждении здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель:

Кандидат биологических наук

Иванова Инна Александровна

Официальные оппоненты:

Дубровина Валентина Ивановна, доктор биологических наук, старший научный сотрудник, заведующая лабораторией патофизиологии Федерального казенного учреждения здравоохранения «Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ Иркутский противочумный институт Роспотребнадзора), (г. Иркутск)

Щелкунов Сергей Николаевич, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник отдела геномных исследований, Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора), (р.п. Колыцово, Новосибирская обл.)

Ведущая организация:

Федеральное казенное учреждение здравоохранения Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора), (г. Ставрополь)

Защита состоится « 18 » января 2024 г. в 14:00 часов на заседании диссертационного совета Д 001.001.XX (24.1.184.01) в ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» по адресу: 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИФКИ и на сайте <http://niikim.ru/ru/диссовет/объявления-диссовета>.

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, кандидат биологических наук
Облеухова И.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Известно, что вакцины вызывают как активацию, так и супрессию отдельных иммунных функций, а вакцинация лиц с нарушениями иммунного статуса может усугубить эти нарушения и быть неэффективной [Симбирцев и др., 2011]. Поэтому ведется активный поиск адьювантов, способных, во-первых, усилить иммунизирующее действие современных вакцин, особенно у лиц с вторичными иммунодефицитами, а во-вторых, направить развитие иммунного ответа по гуморальному или клеточному типу в зависимости от свойств патогена [Алпатов и др., 2020; Meyer, Zepp, 2022].

В практической медицине уже используется несколько вакцин, в составе которых присутствуют иммуномодуляторы: полиоксидоний включен в поливакцину для терапии и профилактики хронической герпетической инфекции [Баринский и др., 2014], в противогриппозную вакцину «Гриппол» [Пинегин, Латышева, 2001]. Еще одна отечественная вакцина против гриппа с иммуномодулятором совидон – «Совигрипп» доказала свою безопасность и эффективность и успешно применяется на территории Российской Федерации [Никифорова и др., 2014].

Данные литературы свидетельствуют о положительных результатах применения иммуномодуляторов для совершенствования специфической и экстренной профилактики особо опасных инфекций. Так, показана целесообразность введения в схему экстренной и специфической профилактики сибирязязвенной инфекции ликопида и сальмозана [Ефременко и др., 2004] и иммунофарма [Волков и др. 2015].

Использование полиоксидония при моделировании противотуберкулезного вакцинного процесса стимулировало функциональную активность иммунокомпетентных клеток и антителопродукцию у экспериментальных животных ([Кравцов и др., 2016]. Применение полиоксидония в схеме специфической профилактики чумы [Пономарева и др., 2014; Бугоркова и др., 2017; Клюева и др., 2019] способствовало повышению иммуногенной и протективной активностей живой противочумной вакцины.

Продолжительные эпидемии, появление новых штаммов, вызывающих тяжелые клинические формы, привлекают внимание медицинских кругов к проблеме совершенствования экстренной, специфической и неспецифической профилактики холеры [Shaikh et al., 2020]. В России на базе ФКУН Российского научно-исследовательского противочумного института "Микроб" Роспотребнадзора производят лицензированную на национальном уровне вакцину холерную бивалентную химическую таблетированную. Она представляет собой смесь холерогена-анатоксина и О-антигенов, полученных из инактивированных бульонных культур *Vibrio cholerae* O1 классического биовара штаммов 569В или KM-76 серовара Инаба и М-41 серовара Огава [Онищенко и др., 2011]. Антиоксические и вибриоцидные антитела выявляются у вакцинированных до полугода. Вакцинация против холеры включена в календарь профилактических прививок по

эпидемическим показанием. Однако известно, что вакцины, созданные на основе инактивированных возбудителей, очищенных и рекомбинантных антигенов, обладают недостаточной иммуногенностью [Медуницын и др., 2012]. В связи с этим должны быть продолжены как разработки новых химических отечественных вакцин против холеры, вызванной *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп, так и поиск новых подходов к совершенствованию существующих профилактических препаратов против этой инфекции [Онищенко и др., 2011]. Учитывая, что эффективность вакцинации зависит не только от качества и свойств вакцин, но и от особенностей генотипа индивидуума, целесообразно создание вакцин с включением в них стимулирующих компонентов, что позволит повысить их иммуногенность целенаправленным действием на иммунную систему организма [Петров, Хаитов, 2011]. Полученные ранее результаты свидетельствуют о возможности использования иммунопрепаратов для повышения иммуногенной активности отдельных антигенов холерного вибриона [Петров и др., 1991; Иванова и др., 2013], а также для неспецифической профилактики холеры [Иванова и др., 2012]. Другие исследования по изучению влияния различных иммуномодуляторов на иммуногенную и протективную активность существующих противохолерных вакцин в нашей стране и за рубежом не проводились.

Таким образом, учитывая вышеизложенное, а также анализ состояния проблемы повышения эффективности противохолерной вакцинации, подход с использованием комплекса вакцины и иммуномодулирующих препаратов может быть полезен для совершенствования специфической профилактики этого заболевания. Представляется актуальным экспериментальное обоснование применения иммуномодуляторов для повышения иммуногенных и протективных свойств вакцины холерной бивалентной химической таблетированной (ФКУН Российский научно-исследовательский противочумный институт "Микроб" Роспотребнадзора).

Цель исследования: изучить влияние иммуномодулирующих препаратов полиоксидония, дерината, ликопида на формирование поствакцинального противохолерного иммунитета. Оценка возможности применения этих препаратов для повышения эффективности специфической профилактики холеры.

В соответствии с поставленной целью были определены следующие **задачи:**

1. Изучить действие полиоксидония, ликопида, дерината на количественный и качественный состав лимфоцитов вакцинированных экспериментальных животных.
2. Оценить влияние полиоксидония, ликопида, дерината на экспрессию маркеров ранней и поздней активации на поверхности иммунокомпетентных клеток периферической крови, их цитокинпродуцирующую способность у вакцинированных белых мышей.
3. Исследовать действие полиоксидония, ликопида, дерината на формирование поствакцинального гуморального противохолерного иммунитета: выработку специфических иммуноглобулинов в сыворотке крови, количество антигенспецифических

антителообразующих клеток и секреторного иммуноглобулина А в тонком кишечнике экспериментальных животных.

4. Провести сравнительную оценку влияния полиоксидония, ликопида, дерината на протективную активность вакцины холерной бивалентной химической, в том числе и при снижении вакцинирующей дозы.

5. Оценить эффективность иммуномодуляторов полиоксидония, ликопида, дерината при их сочетанном применении с холерной вакциной и их влияние на напряженность противохолеpnого иммунитета в ранние и отдаленные сроки поствакцинального периода.

Научная новизна работы

Впервые оценена целесообразность применения иммуномодулирующих препаратов полиоксидония, дерината, ликопида для повышения эффективности специфической профилактики холеры.

Впервые получены данные, свидетельствующие о том, что полиоксидоний, деринат, ликопид в первый месяц поствакцинального периода усиливают иммуногенные свойства антигенов, входящих в состав вакцины холерной бивалентной химической, и увеличивают напряженность противохолеpnого иммунитета через семь месяцев после прививки.

Впервые выявлено, что у вакцинированных белых мышей увеличивается экспрессия маркеров ранней ($CD69^+$, $CD38^+$) и поздней ($CD23^+$) активации на мембранах иммунокомпетентных клеток периферической крови, а введение иммуномодуляторов, особенно полиоксидония и ликопида, стимулирует этот процесс.

Впервые установлено, что под влиянием полиоксидония, дерината, ликопида у экспериментальных животных уже к концу первой недели после вакцинации увеличивается относительное содержание $CD3^+$, $CD4^+$ и $CD19^+$ лимфоцитов как в селезенке, так и в пейеровых бляшках.

Впервые показано, что введение противохолеpnой вакцины усиливает продукцию иммунокомпетентными клетками периферической крови белых мышей провоспалительных цитокинов (ИЛ-4 и ИЛ-10), а полиоксидоний, деринат и ликопид стимулируют этот процесс.

Получены новые данные о действии иммуномодуляторов на гуморальное звено поствакцинального противохолеpnого иммунитета, свидетельствующие о том, что применение при вакцинации полиоксидония, дерината, ликопида способствует повышению продукции специфических иммуноглобулинов в сыворотке крови, увеличению количества антителообразующих клеток в пейеровых бляшках, и, как следствие, секреторного иммуноглобулина А в тонком кишечнике экспериментальных животных.

Впервые доказано, что полиоксидоний, деринат и ликопид в разной степени повышают протективную активность антигенов, входящих в состав холерной вакцины. Наиболее эффективно увеличивает защитные свойства профилактического препарата ликопид, введение которого предотвращает развитие инфекции у всех вакцинированных белых мышей и взрослых

кроликов, в том числе и при снижении вакцинирующей дозы, а также в три раза повышает протективность вакцины через семь месяцев после прививки (патент «Способ повышения эффективности противохолерной вакцинации в эксперименте» (№ 2691411 от 30.06.2019 г.).

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты исследования расширяют представление о методах совершенствования специфической профилактики холеры. Данные, полученные в работе, свидетельствуют о том, что введение иммуномодуляторов в схему вакцинации против холеры способствует повышению ее эффективности. Практическое значение работы заключается в отборе наиболее эффективных иммунопрепаратов и экспериментальном обосновании схемы их использования для повышения иммуногенных и протективных свойств холерной вакцины. Увеличение иммуногенности и протективности холерной вакцины за счет ее сочетанного применения с иммуномодуляторами, особенно с липоидом, является одним из подходов к совершенствованию специфической профилактики холеры. Одновременное введение липоида и холерной вакцины увеличивает эффективность вакцинации и дает возможность снижения рекомендуемой дозы вакцины, что приводит к уменьшению антигенной нагрузки на макроорганизм. Применение иммуномодуляторов может служить одним из способов усиления антителопродукции в процессе получения сывороток к антигенам холерного вибриона. Результаты исследования легли в основу методических рекомендаций «Способ повышения иммуногенности таблетированной бивалентной противохолерной вакцины» (протокол № 6 от 15.08.2017). Данный методический подход используется в работе ФБУН РостовНИИ микробиологии и паразитологии Роспотребнадзора (акт внедрения от 01.12.2021 г.). Предложен способ, позволяющий усилить протективную способность холерной вакцины с помощью липоида на всех этапах формирования поствакцинального иммунитета, в том числе и при снижении дозы вакцины (патент № 2691411 от 30.06.2019 «Способ повышения эффективности противохолерной вакцинации в эксперименте»).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Полиоксидоний, липоид, деринат усиливают иммуногенность противохолерной вакцины, стимулируя экспрессию маркеров ранней и поздней активации на иммунокомпетентных клетках и их цитокинпродуцирующую способность, увеличивая относительное содержание $CD3^{+}$, $CD4^{+}$, $CD19^{+}$ -лимфоцитов, выработку специфических иммуноглобулинов в сыворотке крови, повышая количество антигенспецифических антителообразующих клеток и секреторного иммуноглобулина А в тонком кишечнике вакцинированных экспериментальных животных.

2. Полиоксидоний, липоид, деринат увеличивают протективность вакцины холерной бивалентной химической, но в разной степени. Липоид наиболее эффективно стимулирует протективные свойства противохолерной вакцины, способствуя защите от развития экспериментальной холеры наибольшего числа взятых в эксперимент животных, в том числе

вакцинированных сниженной дозой профилактического препарата, как через месяц, так и через семь месяцев после прививки.

Степень достоверности результатов

Результаты получены с использованием высокоинформативных методов исследования *in vivo* и *in vitro*, с достаточной выборкой экспериментальных животных, в соответствии с основными принципами работы с лабораторными живыми объектами и большим объемом материала, который подвергнут адекватному статистическому анализу, что позволило обосновать научные положения и выводы.

Апробация материалов диссертации

Основные положения диссертации доложены на научных конференциях:

Межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные проблемы диагностики инфекционных заболеваний» (Ростов-на-Дону, 2015); Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 95 лет со дня рождения акад. РАМН И.Н. Блохиной «Современные технологии в эпидемиологическом надзоре за актуальными инфекциями» (Н. Новгород, 2016); Региональной научно-практической конференции, посвященной 95-летию со дня образования государственной санитарно-эпидемиологической службы РФ «Актуальные вопросы эпидемиологии, микробиологии и диагностики инфекционных и паразитарных заболеваний в Ростовской области» (Ростов-на-Дону, 2017); XI Съезд Общероссийской общественной организации «Всероссийское научно-практическое общество эпидемиологов, микробиологов и паразитологов» (ВНПОЭМП) «Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения» (Москва, 2017); IX Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням с международным участием (Москва, 2017); IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания» (Сочи, 2017); XIV межгосударственной научно-практической конференции, посвященной 100-летию ФКУН РосНИПЧИ «Микроб» «Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ, в том числе на территории трансграничных природных очагов чумы» (Саратов, 2018); X Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням с международным участием (Москва, 2018); Проблемной комиссии «Холера и патогенные для человека вибрионы» (Ростов-на-Дону, 2016, 2017, 2018, 2019 гг.); Межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными заболеваниями на юге России. Ермольевские чтения» (Ростов-на-Дону, 2021).

Личный вклад автора

Результаты, представленные в диссертационной работе, получены автором либо при его непосредственном участии.

Публикации

По материалам диссертации опубликована 21 печатная работа, в том числе 12 статей (7 в журналах, рекомендованных ВАК для публикации материалов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, из них 5 статей в журналах международных баз данных Web of Science и Scopus), 1 патент на изобретение.

Структура и объем диссертации

Материал диссертации изложен на 138 страницах машинописного текста, иллюстрирован 12 рисунками и 11 таблицами. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов исследований, обсуждения результатов собственных исследований, заключения и выводов. Библиографический указатель содержит 234 цитируемых источника (в том числе 124 работы отечественных авторов)

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Экспериментальные животные: В работе использованы беспородные белые мыши обоих полов (весом 16 – 20 г в возрасте 6 (начало эксперимента) - 10 недель (окончание эксперимента) и взрослые кролики обоих полов (весом 1,6-2,0 кг в возрасте 1,5-2 мес. (начало эксперимента) и весом 3,5-4,0 кг в возрасте 8,5-9 мес. (конец эксперимента), полученные из питомника ФКУЗ Ростовский противочумный институт Роспотребнадзора. Забор материала осуществляли в первую половину рабочего дня. Животных содержали согласно ГОСТу 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур». При работе с экспериментальными животными руководствовались международными принципами, изложенными в «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей» ETS N 123 (Страсбург, 1986), Приказом Минздрава РФ от 01.04.2016 № 199Н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики», на все эксперименты получено положительное заключение Комиссии по биомедицинской этике ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол №9 от 27.11.2019).

Иммунопрепараты: Вакцина холерная бивалентная химическая, таблетки (ФКУН Российский научно-исследовательский противочумный институт "Микроб" Роспотребнадзора); полиоксидоний (ПО) (ООО «НПО Петровакс Фарм», Россия) (азоксимера бромид - сополимер N-окси-1,4-этиленпиперазина и N-карбокси-1,4-этиленпиперазина бромид) – лиофилизат для приготовления раствора для инъекций и местного применения 6 мг; деринат (ДЕ) (ЗАО «ФП «Техномедсервис», Россия) (дезоксирибонуклеат натрия - натриевая соль дезоксирибонуклеиновой кислоты) - раствор для внутримышечного введения 15 мг/мл; липоид (ЛИ) (ЗАО «Пептею», Россия)

(глюкозаминилмурамилдипептид – синтетический аналог структурного фрагмента оболочки (пептидогликана) бактериальных клеток) – таблетки по 10 мг.

Дозы и схема применения иммунопрепаратов: Вакцину растворяли в ЗФР (рН 7,2) и разводили (в 1,0 мл ЗФР для взрослых кроликов; в 0,1 мл ЗФР для мышей) до прививочной дозы, которую рассчитывали согласно весу вакцинируемых животных, исходя из человекодозы, рекомендованной производителем. Дозу иммуномодуляторов рассчитывали, исходя из человекодозы, рекомендованной производителями. Для этого препараты разводили в ЗФР (рН 7,2). Перед вакцинацией экспериментальных животных поили 5% раствором пищевой соды (взрослых кроликов – по 2 мл, мышей – по 0,1 мл) для снижения повреждающего действия желудочного сока на противохолерную вакцину. Вакцину вводили перорально взрослым кроликам с помощью зонда, беспородным белым мышам – с помощью хирургических игл с насаженными на них полиэтиленовыми оливами. Одновременно с вакциной экспериментальным животным однократно вводили иммуномодуляторы: ПО (внутримышечно, во внутреннюю поверхность бедра задней лапы) – взрослому кролику по 0,17 мг, белой мыши по 1,7 мкг; ДЕ (внутримышечно, во внутреннюю поверхность бедра задней лапы) – взрослому кролику по 2,0 мг, белой мыши по 20,0 мкг; ЛИ перорально – взрослому кролику по 0,285 мг, белой мыши по 2,85 мкг. Животным контрольных групп давали ЗФР (рН 7,2) в том же объеме и тем же способом.

Оценку влияния иммуномодуляторов на иммуногенность вакцины проводили на первой, второй и третьей неделе поствакцинального периода, **протективную активность** – на модели мышей через месяц и на модели взрослых кроликов через месяц и семь месяцев после вакцинации.

Получение лимфоцитов: Спленоциты получали путем мягкой деструкции селезенок в гомогенизаторе типа Даунса в ЗФР. Клетки дважды отмывали центрифугированием при 100g в течение 7-10 мин в настольной центрифуге MPW-340 (Польша). Пейеровы бляшки (ПБ) выделяли в стерильных условиях в ламинарном укрытии. Для стерильного выделения кишечника осуществляли разрез кожи и после вскрытия брюшной полости извлекали участок тонкой кишки, ограниченный двумя лигатурами длиной 15 см. Затем 3 раза промывали шприцем выделенные фрагменты, разрезали их, фиксировали на стерильном деревянном столике и выделяли ПБ, имевшие вид мелких белесоватых крупинок. Выделенные ПБ помещали в охлажденную до 4°C культуральную среду RPMI 1640, измельчали путем мягкой деструкции в гомогенизаторе типа Даунса. Клеточную суспензию набирали в 10 мл шприц (игла №16), переносили в центрифужные пробирки объемом 20 мл на слой градиента фикольт-верографин $d=1,077$ г/л и центрифугировали в течение 5 мин при 100g в настольной центрифуге MPW-340 (Польша). Клетки из интерфазы (97% лимфоцитов при подсчете окрашенных мазков) трижды отмывали охлажденной средой путем центрифугирования при 100g в течение 7-10 мин, суспендировали в среде с 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Жизнеспособность полученных лимфоцитов определяли в автоматическом счетчике клеток

«Countess™», окрашивая их 0,2% трипановым синим. Суспензия содержала 90-96% жизнеспособных клеток.

Определение популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов осуществляли с помощью моноклональных антител (МКА) к CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ мыши («Bioscience», США). Спленоциты и лимфоциты ПБ окрашивали МКА, согласно инструкции производителя, и анализировали на проточном цитометре «Navios™» («Beckman Coulter», США). Для выделения области лимфоцитов использовали антитела к CD45⁺ («Invitrogen», США).

Для изучения профиля цитокинов свежую кровь мышей, взятую в емкость с гепарином (20 МЕ/мл), тщательно перемешивали и разводили средой RPMI 1640 с добавлением 2 мМ глутамина и 80 мкг/мл гентамицина до концентрации 2x10⁷/мл. Для изучения стимулированной продукции цитокинов в среду добавляли конканавалин А (Пан Эко, Россия) (15 мкг/мл). Пробы от опытных и контрольных животных инкубировали при температуре 37°C в течение суток. Затем центрифугировали при 100g в течение 15 мин в настольной центрифуге MPW-340 (Польша). В супернатантах методом иммуноферментного анализа (ИФА) определяли спонтанную и стимулированную продукцию цитокинов, используя наборы для определения ИФ-γ, ФНО-α, ИЛ-4, ИЛ-10 мыши (Cloud-Clone Corp., США) в соответствии с рекомендациями производителя. Измерения проводили на многофункциональном ридере «Synergy™2» для работы в микропланшетном формате при длине волны 450 нм.

Оценку экспрессии маркеров активации лимфоцитов проводили на 3, 5, 7, 14, 21 сутки поствакцинального периода. Для этого у лабораторных животных осуществляли забор крови в пробирки с антикоагулянтом. Затем цельную кровь лизировали раствором OPTILYSE C («Beckman Coulter», USA), окрашивали МКА к CD23⁺, CD38⁺ и CD69⁺ («Invitrogen», США) мыши согласно инструкции производителя, и анализировали на проточном цитометре «Navios™» («Beckman Coulter», США). Для выделения области лимфоцитов использовали антитела к CD45⁺ («Invitrogen», США).

Количество антителообразующих клеток (АОК) нейловых бляшек определяли с помощью метода иммуноферментных зон ELISPOT [Russell, 1987].

Количество секреторного иммуноглобулина А (sIgA) оценивали в промывных водах тонкого кишечника мышей методом ИФА с помощью набора «Enzyme-linked immunosorbent assay kit for sIgA» (США), согласно инструкции производителя. Измерения проводили на многофункциональном ридере «Synergy™2» для работы в микропланшетном формате при длине волны 450 нм.

Общий титр противохолерных антител в сыворотке крови кроликов определяли в твердофазном ИФА с помощью экспериментальной тест-системы. В лунки полистиролового планшета для иммуноферментного анализа вносили по 100 мкл убитой кипячением суточной культуры *V. cholerae* O1 в концентрации 10⁸ и инкубировали в холодильнике в течение суток

для сенсibilизации лунок антигеном. После инкубации антиген удаляли, лунки пятикратно промывали раствором фосфатно-солевого буфера с 10% твин 20 (ФСБ-Т) и вносили во все лунки по 100 мкл 1% раствора бычьего сывороточного альбумина в ФСБ-Т для блокировки несвязавшихся участков. После инкубации при 37°С в течение часа, не промывая, вносили по 100 мкл исследуемых сывороток в разведениях от 1:25 до 1:15625. Разведения сывороток готовили на блокирующем растворе 1% БСА в ФСБ-Т. Отрицательным контролем являлась лунка без исследуемой сыворотки. В качестве положительного контроля использовали коммерческую холерную О-сыворотку (ФКУН противочумный институт «Микроб», Саратов). Титр контрольной сыворотки в иммуноферментном анализе составил 1:3125. Инкубировали при 37°С в течение часа. Затем отмывали и вносили по 100 мкл меченных пероксидазой хрена антител козы к IgG, А, Микролика (Имтек, Россия) с рабочим разведением 1:10000. Инкубировали при 37°С в течение часа. После пятикратной отмывки раствором ФСБ-Т вносили по 100 мкл хромогена – раствора тетраметилэтилендиамина (ТМБ) и инкубировали в темноте при комнатной температуре 15-30 минут. После этого реакцию останавливали добавлением 100 мкл стоп-реагента и определяли оптическую плотность на многофункциональном ридере «Synergy™2» для работы в микропланшетном формате при длине волны 450 нм. Результаты учитывали при отрицательном контроле не более 0,2. Эксперимент проводили в трех повторностях, рассчитывали среднегеометрическое значение титров [Щуковская, 1984].

Метод получения генерализованной инфекции на мышах: Культуру *V. cholerae classical 569B* выращивали при температуре 37°С в течение 18 час и готовили 1 млрд. взвесь в 3ФР по стандарту мутности. Агар Нобля (Difco) растворяли в дистиллированной воде, кипятили в течение 30 мин на водяной бане при постоянном помешивании, охлаждали до 45°С и соединяли с 1 млрд. взвесью культуры в соотношении 1:1 до конечной концентрации агара 0,2%. Полученной взвесью *V. cholerae* в агаризованном растворе 3ФР заражали мышей внутрибрюшинно в дозе 2×10^8 микробных клеток в объеме 0,2 мл. 100% гибель животных контрольной группы в течение суток подтверждала развитие генерализованной формы холеры.

Модель изолированной петли тонкого кишечника взрослого кролика: Животных после вакцинации и контрольной группы выдерживали без пищи 24 часа. После введения миорелаксанта ксилосина (из расчета 0,15 мл на 1 кг веса) делали разрез по средней линии живота и извлекали петли тонкого кишечника, накладывали двойные лигатуры, перевязывая одинаковые участки кишечника длиной 10-12 см с промежутками между ними 4-5 см. В одну лигированную петлю вводили 1 мл 3ФР (контрольная петля), в другую – 1 мл 3ФР, содержащий 1×10^9 клеток 18-часовой культуры вирулентного штамма *V. cholerae classical 569B* (опытная петля). После этого брюшную стенку зашивали. Спустя 16-18 часов животных эвтаназировали хлороформом и вскрывали. Об энтеропатогенном эффекте судили по наличию/выраженности в опытной петле тонкого кишечника отека слизистой и подслизистой

оболочек, кровоизлияния и некроза покровного эпителия ворсин. Об холерогенном эффекте судили по присутствию жидкости в опытной петле. Выраженность этого эффекта рассчитывали по коэффициенту растяжения петли, который высчитывали по формуле:

$$\text{Коэффициент растяжения петли (К)} = \frac{\text{объем жидкости}}{\text{длина петли}}$$

$K > 1,0$ свидетельствует о наличии холерогенного эффекта.

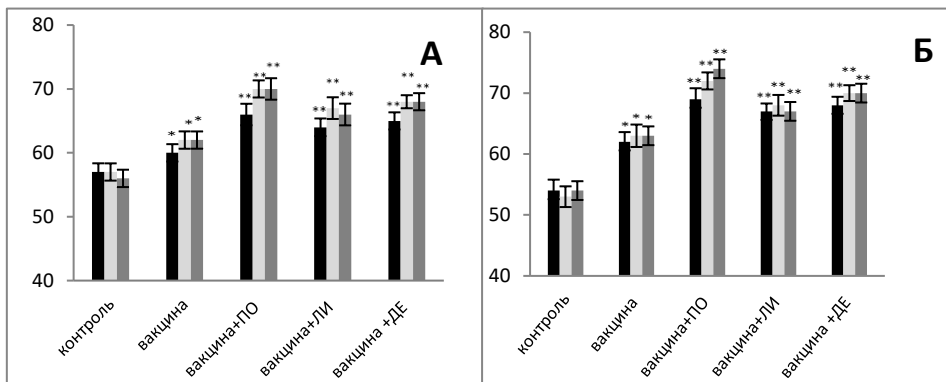
Статистическую обработку результатов исследований осуществляли с помощью программ Microsoft Excel 2010 и StatSoft Statistica Windows 10.01. При нормальном распределении достоверность различий определяли по t-критерию Стьюдента для независимых наблюдений. В случае ненормального распределения для определения статистической значимости отличий использовали критерий Манна-Уитни. Уровень $p < 0,05$ оценивался как значимый. Корреляции между исследуемыми параметрами устанавливались с использованием коэффициента корреляции Спирмана и критерия корреляции Пирсона. При интерпретации для оценки силы связи использовали шкалу Чеддока. Отличия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

При исследовании влияния вакцинации на популяционный состав клеток селезенки и пейеровых бляшек (ПБ) мышей выявлено увеличение, по сравнению с интактными, относительного количества $CD3^+$ лимфоцитов селезенки и пейеровых бляшек, начиная с 7 суток поствакцинального периода (рис. 1). При изучении действия ПО, ДЕ и ЛИ на популяционный состав лимфоцитов селезенки и ПБ вакцинированных мышей, показано, что с седьмых суток после прививки и введения иммунопрепаратов в этих органах достоверно ($p < 0,05$), по сравнению с только вакцинированными животными, увеличивается относительное количество Т-лимфоцитов (рис. 1).

Также к концу первой недели у вакцинированных мышей, наблюдалось статистически значимое по сравнению с контрольной группой животных увеличение процентного содержания В-лимфоцитов как в селезенке, так и в ПБ. У животных опытных групп, получавших при вакцинации иммуномодуляторы, но особенно полиоксидоний, на 7-21 день наблюдения в селезенке и ПБ было зарегистрировано значительное увеличение относительного числа $CD19^+$ лимфоцитов (рис. 2).

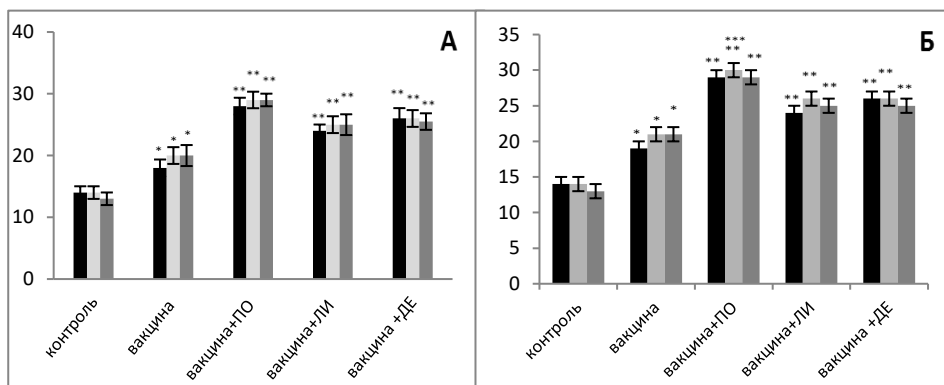
Выявлено также, что повышение количества Т-клеток обусловлено увеличением относительного содержания субпопуляции $CD4^+$ лимфоцитов, которое наблюдается в селезенке, начиная с седьмых суток после вакцинации (рис. 3А), и в ПБ с 14 суток после введения вакцины во всех опытных группах мышей, но в большей степени под влиянием полиоксидония (рис. 3Б).



Примечание: ПО - полиоксидоний, ЛИ - липоид, ДЕ - деринат. Темные столбики – относительное содержание лимфоцитов на 7 сутки поствакцинального периода; светлые столбики – через 14 дней после вакцинации; серые столбики – через 21 день после прививки. Данные представлены в виде $M \pm SD$; $n=10$ в каждой группе;

* - достоверное различие ($p < 0,05$) по отношению к данному показателю у интактных животных; ** - достоверное различие ($p < 0,05$) по отношению к аналогичным показателям у вакцинированных животных

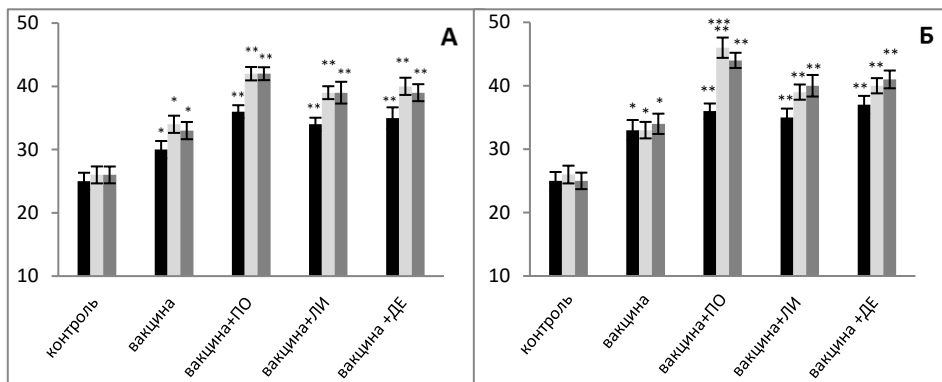
Рис 1. Влияние иммуномодуляторов на относительное количество (%) $CD3^+$ лимфоцитов в селезенке (А) и пейеровых бляшках (Б) вакцинированных мышей



Примечание: ПО - полиоксидоний, ЛИ - липоид, ДЕ - деринат. Темные столбики – относительное содержание лимфоцитов на 7 сутки поствакцинального периода; светлые столбики – через 14 дней после вакцинации; серые столбики – через 21 день после прививки. Данные представлены в виде $M \pm SD$; $n=10$ в каждой группе;

* - достоверное различие ($p < 0,05$) по отношению к данному показателю у интактных животных; ** - достоверное различие ($p < 0,05$) по отношению к аналогичным показателям у вакцинированных животных; *** - достоверное различие ($p < 0,05$) по отношению к аналогичным показателям у вакцинированных животных с другими иммуномодуляторами

Рисунок 2. Сравнительная оценка влияния иммуномодуляторов на относительное содержание (%) В-лимфоцитов в селезенке (А) и пейеровых бляшках (Б) вакцинированных мышей



Примечание: ПО - полиоксидоний, ЛИ - ликопид, ДЕ - деринат. Темные столбики – относительное содержание лимфоцитов на 7 сутки поствакцинального периода; светлые столбики – через 14 дней после вакцинации; серые столбики – через 21 день после прививки. Данные представлены в виде $M \pm SD$; $n=10$ в каждой группе;

* - достоверное различие ($p < 0,05$) по отношению к данному показателю у интактных животных; ** - достоверное различие ($p < 0,05$) по отношению к аналогичным показателям у вакцинированных животных; *** - достоверное различие ($p < 0,05$) по отношению к аналогичным показателям у вакцинированных животных с другими иммуномодуляторами

Рисунок 3. Влияние иммуномодуляторов на относительное содержание (%) $CD4^+$ лимфоцитов в селезенке (А) и пейеровых бляшках (Б) вакцинированных мышей

Следует отметить, что выраженного изменения количества цитотоксических лимфоцитов у животных всех групп, по сравнению с интактными, не наблюдалось.

Выявлено, что у вакцинированных мышей увеличивается продукция противовоспалительных цитокинов - ИЛ-4 и ИЛ-10, характерных для Th2 типа иммунного ответа - в отличие от провоспалительных – ФНО- α и ИФ- γ (табл. 1). Иммуномодуляторы стимулировали цитокинпродуцирующую активность лимфоцитов вакцинированных животных. Такая же тенденция сохранялась и на седьмые сутки после прививки.

Установлено, что противохолерная вакцинация способствует увеличению экспрессии $CD69^+$, $CD38^+$ и $CD23^+$ на поверхности лимфоцитов у экспериментальных животных. Введение иммуномодуляторов положительно влияет на этот процесс, но по-разному и в зависимости от молекул активации. Повышенная, по сравнению с вакцинированными животными, экспрессия $CD69^+$ и $CD23^+$ была зарегистрирована нами у животных, которые при вакцинации получали полиоксидоний и ликопид. При сравнении влияния иммуномодуляторов на количество $CD38^+$ выявлено, что полиоксидоний в большей степени стимулирует этот процесс, чем деринат и ликопид (табл. 2).

Таблица 1 - Продукция цитокинов (пг/мл) иммунокомпетентными клетками периферической крови вакцинированных мышей на третий сутики поствакцинального периода ($M \pm SD$)

Продукция цитокинов:		Группы животных:				
		контроль ные	вакциниро ванные	вакцинированные		
				+ПО	+ЛИ	+ДЕ
ИФ- γ	спонтанная	45,6 \pm 2,4	49,9 \pm 2,4	46,6 \pm 2,9	50,9 \pm 2,1	48,9 \pm 2,4
	Кон А	66,4 \pm 4,5	73,2 \pm 4,3	69,2 \pm 3,3	67,2 \pm 4,2	68,2 \pm 3,3
ФНО- α	спонтанная	3,1 \pm 0,9	4,6 \pm 1,2	6,6 \pm 2,2	5,6 \pm 1,9	6,6 \pm 1,2
	Кон А	5,6 \pm 1,2	6,9 \pm 1,3	8,9 \pm 2,3	9,0 \pm 2,3	6,9 \pm 2,3
ИЛ-4	спонтанная	9,4 \pm 2,0	15,7 \pm 2,1 *	26,5 \pm 2,6 ***	25,7 \pm 2,6 ***	29,7 \pm 2,8 ***
	Кон А	15,7 \pm 2,8	22,5 \pm 2,0 *	29,8 \pm 2,2 ***	28,4 \pm 2,5 ***	30,5 \pm 2,4 ***
ИЛ-10	спонтанная	13,1 \pm 2,7	29,7 \pm 2,1 *	39,7 \pm 3,5 ***	40,2 \pm 3,4 ***	37,7 \pm 3,5 ***
	Кон А	19,6 \pm 3,0	36,7 \pm 3,3 *	46,7 \pm 3,4 ***	48,6 \pm 3,2 ***	46,7 \pm 2,5 ***

Примечание: ПО - полиоксидоний, ЛИ - ликопид, ДЕ – деринат; n=10 в каждой группе;

*- достоверное отличие от группы контрольных животных ($p < 0,05$); ** - достоверное отличие от группы вакцинированных животных ($p < 0,05$)

При оценке влияния иммуномодуляторов на количество антигенспецифических антителообразующих клеток (АОК) у мышей в процессе формирования противохолерного иммунитета обнаружено, что у всех вакцинированных животных, получавших иммунопрепараты, особенно у животных из группы с полиоксидонием, наблюдалось статистически достоверное увеличение количества АОК уже на первой неделе поствакцинального периода, по сравнению с вакцинированными мышами (рис. 4), сохраняющееся до конца срока наблюдения. Следует отметить, что у группы с полиоксидонием АОК оставалось выше до конца срока наблюдения, чем у животных, которым вводили деринат и ликопид.

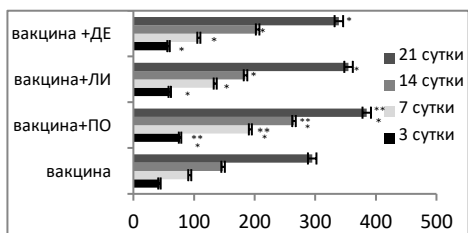
При оценке продукции sIgA в кишечнике вакцинированных мышей выявлено, что уже с первой недели наблюдения у мышей, получавших иммуномодуляторы, синтез sIgA идет более интенсивно, по сравнению с вакцинированной группой животных. Наибольшее количество sIgA зарегистрировано у мышей, получавших полиоксидоний. Этот показатель в два раза превышал концентрацию sIgA у вакцинированных животных. Деринат и ликопид усиливали продукцию антител в тонком кишечнике в полтора раза, по сравнению с вакцинированными мышами. Такая тенденция сохранялась до конца срока наблюдения (рис. 5).

Таблица 2- Оценка экспрессии маркеров активации на мембранах иммунокомпетентных клеток периферической крови вакцинированных мышей и влияния иммуномодуляторов на этот процесс ($M \pm SD$)

CD	сутки после вакци- нации	Группы животных				
		контроль ные	вакциниро- ванные	вакцинированные		
				+ПО	+ЛИ	+ДЕ
69 ⁺	3	3,6 \pm 1,4	26,6 \pm 2,1 *	46,5 \pm 2,8 * **	36,4 \pm 1,9* ** *****	42,9 \pm 2,3 * **
	5		23 \pm 2,3 *	44,0 \pm 2,8 * **	32,0 \pm 2,6* ** *****	39,1 \pm 3,1 * **
	7		19,5 \pm 1,9 *	34,4 \pm 2,1* ** *****	26,5 \pm 2,4* ** *****	34,6 \pm 1,4 * ** *
	14		20,0 \pm 1,6 *	32,1 \pm 2,8 * **	24,6 \pm 2,0 * *****	33,1 \pm 2,4 * **
	21		20,4 \pm 1,4 *	31,8 \pm 1,9 * **	23,4 \pm 2,6 * *****	30,1 \pm 2,1 * **
38 ⁺	3	7,8 \pm 1,2	12,6 \pm 2,8	14,3 \pm 2,3*	10,5 \pm 3,2	12,4 \pm 3,0
	5		12,9 \pm 2,4	25,3 \pm 2,5* ** *****	12,5 \pm 2,2	17,8 \pm 1,2 *
	7		20,6 \pm 2,9 * ***	32,6 \pm 2,4* ** *****	24,4 \pm 1,9 * ***	26,2 \pm 2,4 * ***
	14		26,4 \pm 2,8 *	38,4 \pm 2,1* ** *****	30,5 \pm 2,4 *	25,4 \pm 2,1 *
	21		26,8 \pm 2,8 *	37,9 \pm 2,0* ** *****	30,4 \pm 2,5 *	26,9 \pm 2,8 *
23 ⁺	3	6,3 \pm 1,3	6,9 \pm 1,9	7,2 \pm 1,8	8,7 \pm 2,1	8,1 \pm 2,1
	5		7,0 \pm 1,9	10,5 \pm 2,1	9,6 \pm 2,0	10,4 \pm 1,4
	7		10,8 \pm 2,4	20,5 \pm 2,1 * ** *****	12,6 \pm 2,0* *****	18,4 \pm 1,2 * ** *
	14		12,4 \pm 1,1 *	21,3 \pm 1,9 * **	13,5 \pm 2,4 * *****	18,2 \pm 1,4 * **
	21		12,8 \pm 2,4 *	21,9 \pm 2,5 * **	15,1 \pm 2,5 *	19,5 \pm 1,6 * **

Примечание: ПО - полиоксидоний, ЛИ - лилопид, ДЕ – деринат; n=10 в каждой группе;

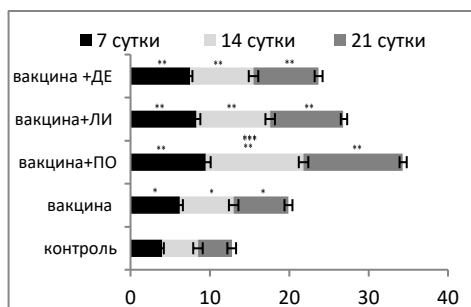
* - достоверное различие ($p < 0,05$) по отношению к данному показателю у интактных животных; ** - достоверное различие ($p < 0,05$) по отношению к аналогичным показателям у вакцинированных животных; *** - достоверное различие ($p < 0,05$) по отношению к предыдущему показателю внутри группы; **** - достоверное различие ($p < 0,05$) по отношению к аналогичным показателям у животных, получавших разные иммуномодуляторы.



Примечание: ПО - полиоксидоний, ЛИ - ликолипид, ДЕ - деринат. Данные представлены в виде $M \pm SD$, $n=10$ в каждой группе;

* - достоверное различие ($p < 0,05$) по отношению к аналогичным показателям у вакцинированных животных; ** - достоверное различие ($p < 0,05$) по отношению к аналогичным показателям с другими иммуномодуляторами

Рис. 4. Влияние иммуномодуляторов на количество антителообразующих клеток в пейеровых бляшках вакцинированных мышей



Примечание: ПО - полиоксидоний, ЛИ - ликолипид, ДЕ - деринат. Данные представлены в виде $M \pm SD$, $n=10$ в каждой группе;

* - достоверное различие ($p < 0,05$) по отношению к данному показателю у интактных животных; ** - достоверное различие ($p < 0,05$) по отношению к аналогичным показателям у вакцинированных животных; *** - достоверное различие ($p < 0,05$) по отношению к аналогичным показателям с другими иммуномодуляторами

Рис. 5. Продукция (пг/мл) sIgA в кишечнике вакцинированных мышей и влияние иммуномодуляторов на этот процесс

При изучении влияния иммуномодуляторов на выработку специфических антител в организме привитых животных показано, что в первую неделю поствакцинального периода у всех опытных взрослых кроликов в сыворотке крови наблюдался одинаковый уровень продукции противохолерных иммуноглобулинов. Через две недели после вакцинации количество специфических антител у вакцинированных и получавших иммуномодуляторы кроликов становилось выше, чем у только иммунизированных.

К концу третьей недели после вакцинации отмечалось снижение антителопродукции в сыворотке крови у группы привитых животных, а также у вакцинированных кроликов, получавших деринат и ликолипид. Только у животных, привитых полиоксидонием, сохранялся титр специфических антител на прежнем уровне (рис. 6).

Через семь месяцев после начала эксперимента у вакцинированных и получавших иммуномодуляторы животных также регистрировались более высокие титры противохолерных антител, но особенно у кроликов из группы с ликолипидом (рис. 7).

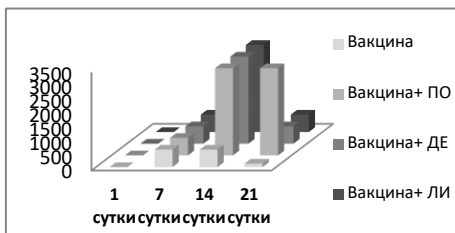


Рис. 6. Влияние иммунокоррекции на синтез противохолерных иммуноглобулинов в сыворотке крови взрослых кроликов в первый месяц поствакцинального периода

Примечание: ПО - полиоксидоний, ЛИ - ликопид, ДЕ – деринат; n=4 в каждой группе

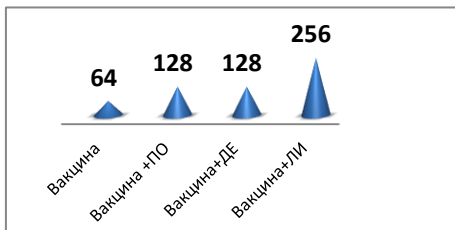


Рис. 7. Среднегеометрическое значение титров противохолерных иммуноглобулинов в сыворотке крови взрослых кроликов через семь месяцев после вакцинации

Примечание: ПО - полиоксидоний, ЛИ - ликопид, ДЕ – деринат; n=4 в каждой группе

Способность полиоксидония, ликопида, дерината повышать протективную активность вакцины таблетированной бивалентной химической холерной была изучена нами на модели перевязанной петли тонкого кишечника взрослого кролика и модели генерализованной формы холеры у мышей.

При оценке патологоанатомической картины в перевязанных петлях тонкого кишечника у интактных зараженных животных контрольной группы выявлены признаки ярко выраженных энтеропатогенного и холерогенного эффектов.

Результаты заражения контрольных вакцинированных животных свидетельствовали о наличии достаточно напряженного поствакцинального иммунитета через месяц после вакцинации: у 75 % кроликов отсутствовали как холерогенный, так и энтеропатогенный эффекты. Только у 25 % животных регистрировалось наличие жидкости в опытных петлях кишечника ($K > 1$), проявления энтеропатогенного эффекта отмечено не было (табл. 3).

У вакцинированных животных, получавших иммуномодуляторы, при заражении через месяц не было выявлено патоморфологических изменений в опытных петлях тонкого кишечника, то есть энтеропатогенный и холерогенный эффекты отсутствовали в 100% случаев (табл. 3).

Через семь месяцев наблюдения напряженность противохолерного иммунитета значительно снизилась: у 75% вакцинированных кроликов наблюдались признаки развития экспериментальной холеры. Влияние полиоксидония, ликопида, дерината на протективную активность холерной вакцины спустя семь месяцев после прививки проявлялось в разной степени. Признаков развития заболевания не регистрировалось у 75% животных из группы с ликопидом, у 25% кроликов из этой группы развивался только холерогенный эффект (табл. 3).

Таблица 3 - Влияние иммуномодуляторов на наличие/выраженность холерогенного и энтеропатогенного эффектов у взрослых кроликов в разные сроки поствакцинального периода (M±SD)

Группы животных:		Наличие/выраженность			
		холерогенного эффекта		энтеропатогенного эффекта	
		% животных	коэффициент растяжения петли (K)	% животных	степень проявления
		через месяц после вакцинации			
контрольная		100	1,14±0,06	100	сильная
вакцинированные		25	1,1±0,08	0	отсутствует
вакцини- рованные	+ ПО	0	0,15±0,09	0	отсутствует
	+ ДЕ	0	0,14±0,07	0	отсутствует
	+ ЛИ	0	0,12±0,06	0	отсутствует
		через 7 месяцев после вакцинации			
контрольная		100	1,18±0,06	100	сильная
вакцинированные		75	1,12±0,08	75	слабая
вакцини- рованные	+ ПО	50	1,04±0,02	0	отсутствует
	+ ДЕ	50	1,06±0,04	50	слабая
	+ ЛИ	25	1,05±0,02	0	отсутствует

Примечание: ПО - полиоксидоний, ЛИ - ликопид, ДЕ – деринат; при K>1 – наличие холерогенного эффекта; n=4 в каждой группе

Патоморфологическая картина, характерная для холерогенного эффекта, наблюдалась у 50% животных из групп с полиоксидонием и деринатом, причем у вакцинированных кроликов, получавших деринат, присутствовал и слабовыраженный энтеропатогенный эффект (табл. 3)

Результаты экспериментов по изучению возможности снижения рекомендуемой дозы противохолерной вакцины при ее сочетанном применении с иммуномодуляторами показали, что после заражения кроликов признаки развития заболевания не регистрировались только у взятых в эксперимент животных, получавших ликопид. Деринат и полиоксидоний препятствовали развитию холеры у 50 % вакцинированных сниженной дозой вакцины кроликов. У остальных животных этих групп регистрировались холерогенный и слабо выраженный энтеропатогенный эффекты. Следует отметить, что у вакцинированных половинной дозой вакцины животных наблюдался как холерогенный, так и энтеропатогенный эффекты (табл. 4).

Таблица 4 - Влияние иммуномодуляторов на наличие/выраженность холерогенного и энтеропатогенного эффектов у взрослых кроликов, вакцинированных сниженной дозой вакцины ($M \pm SD$)

Группы животных:		Наличие/выраженность			
		холерогенного эффекта		энтеропатогенного эффекта	
		% живот ных	коэффициент растяжения петли (К)	% живот ных	степень проявления
контрольная		100	$1,25 \pm 0,08$	100	сильная
вакцинированные		100	$1,12 \pm 0,02$	100	средняя
вакцини- рованные	+ПО	50	$1,08 \pm 0,02$	50	слабая
	+ДЕ	50	$1,06 \pm 0,04$	50	слабая
	+ ЛИ	0	$0,19 \pm 0,02$	0	отсутствует

Примечание: ПО - полиоксидоний, ЛИ - ликопид, ДЕ – деринат; при $K > 1$ – наличие холерогенного эффекта; $n=4$ в каждой группе

Оценка способности полиоксидония, ликопида, дерината повышать протективную активность таблетированной бивалентной химической холерной вакцины на модели генерализованной формы холеры на мышах продемонстрировала, что из всех препаратов наибольшей стимулирующей активностью обладал ликопид - выжили 100 % вакцинированных животных. Из группы вакцинированных животных, получавших полиоксидоний, остались живы $90 \pm 6,7\%$ мышей. Эти показатели достоверно ($p < 0,05$) превышали количество выживших вакцинированных мышей ($70 \pm 5,5\%$). У животных из группы с деринатом генерализованная холера не развилась у $80 \pm 4,1\%$ мышей, что не отличалось от количества выживших вакцинированных животных ($p > 0,05$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные в данной работе исследования позволяют заключить, что полиоксидоний, деринат и ликопид повышают иммунологические показатели вакцины холерной бивалентной химической, оказывая стимулирующее действие на формирование противохолерного иммунитета. Под влиянием иммунопрепаратов у экспериментальных животных уже к концу первой недели после вакцинации увеличивается относительное количество Т- и В-лимфоцитов как в селезенке, так и в пейеровых бляшках. У всех опытных белых мышей, получавших иммунотерапию, повышается относительное содержание субпопуляции $CD4^+$ лимфоцитов в селезенке (с седьмых суток поствакцинального периода), и в пейеровых бляшках (с 14 суток), особенно под влиянием полиоксидония. Применение иммуномодуляторов при вакцинации увеличивает экспрессию маркеров ранней и поздней активации на поверхности иммунокомпетентных клеток у вакцинированных животных. Повышенная, по сравнению с группой вакцинированных, экспрессия $CD69^+$ и $CD23^+$ была

зарегистрирована у животных, которые при вакцинации получали полиоксидоний и ликопид. При сравнении влияния иммуномодуляторов на количество CD38⁺ выявлено, что полиоксидоний также в большей степени стимулирует этот процесс. При изучении цитокинового профиля у вакцинированных животных показано, что у всех групп опытных мышей было зарегистрировано увеличение уровня продукции противовоспалительных цитокинов - ИЛ-4 и ИЛ-10. Иммуномодуляторы стимулировали цитокинпродуцирующую активность лимфоцитов вакцинированных животных. Кроме того, совместное введение иммуномодуляторов, особенно полиоксидония, и вакцины приводило к статистически достоверному увеличению количества антигенспецифических антителообразующих клеток уже на первой неделе поствакцинального периода, по сравнению с группой вакцинированных, а также к усилению антителопродукции в сыворотке крови и в кишечнике экспериментальных животных в начальные сроки поствакцинального периода. Через семь месяцев после начала эксперимента у получавших иммуномодуляторы кроликов также регистрировались достоверно более высокие, по сравнению с группой вакцинированных, титры противохолерных антител, но особенно у животных из группы с ликопидом.

Полиоксидоний, деринат и ликопид повышали защитные свойства антигенов, входящих в состав вакцины холерной бивалентной химической, но в разной степени. Применение ликопида было наиболее эффективным. Этот иммуномодулятор через месяц предотвращал развитие инфекции в тонком кишечнике у всех взятых в эксперимент вакцинированных взрослых кроликов, даже после введения сниженной вдвое дозы, и защищал от генерализованной холеры 100 % белых мышей. В отдаленные сроки поствакцинального периода (через семь месяцев после прививки) применение этого препарата в три раза увеличивало протективность противохолерной вакцины. Полиоксидоний стимулировал протективную способность противохолерной вакцины, но несколько уступал в этом ликопиду при моделировании холеры на взрослых кроликах. Положительное влияние дерината на защитные свойства вакцины, но также менее выраженное, чем у ликопида, проявлялось только на модели взрослых кроликов.

На основании проведенного исследования предложен эффективный способ использования полиоксидония, дерината, ликопида для повышения иммуногенных и протективных свойств вакцины холерной бивалентной химической. Данные, полученные в работе, демонстрируют, что применение всех изученных иммуномодуляторов, но особенно полиоксидония, может служить одним из способов усиления антителопродукции в процессе получения сывороток к антигенам холерного вибриона. А одновременное введение ликопида и вакцины холерной бивалентной химической повышает эффективность вакцинации, увеличивая ее защитную способность в ранние и, что особенно важно, поздние сроки поствакцинального периода, дает возможность применения сниженной дозы вакцины, способствуя уменьшению антигенной нагрузки на макроорганизм.

Повышение иммуногенной и протективной активностей холерной вакцины за счет сочетанного применения ее с иммуномодуляторами, особенно с липопептидом, может являться одним из перспективных подходов к совершенствованию специфической профилактики холеры.

ВЫВОДЫ

1. Введение при вакцинации иммуномодуляторов, особенно полиоксидония и липопептида, способствует увеличению числа маркеров ранней ($CD69^+$, $CD38^+$) и поздней ($CD23^+$) активации на мембранах иммунокомпетентных клеток периферической крови экспериментальных животных, что свидетельствует о положительном влиянии иммуномодуляторов на степень активности и зрелости эффекторов системного клеточного и гуморального иммунного ответа вакцинированных белых мышей.

2. Полиоксидоний, деринат и липопептид усиливают спонтанную и стимулированную митогенами продукцию ИЛ-4 и ИЛ-10 иммунокомпетентными клетками периферической крови вакцинированных противохолерной вакциной белых мышей, что указывает на наличие иммуностимулирующего эффекта этих препаратов в отношении продукции противовоспалительных цитокинов.

3. Под действием полиоксидония, дерината, липопептида у белых мышей уже с седьмых суток поствакцинального периода увеличивается относительное содержание $CD3^+$, $CD4^+$ и $CD19^+$ лимфоцитов как в селезенке, так и в пейеровых бляшках, что свидетельствует о влиянии указанных иммуномодуляторов на количественный состав лимфоцитов вакцинированных животных при формировании системного и местного иммунного ответа.

4. Применение при вакцинации полиоксидония, дерината, липопептида повышает продукцию специфических иммуноглобулинов в сыворотке крови экспериментальных животных во все сроки исследования, что указывает на способность данных препаратов стимулировать системный гуморальный противохолерный иммунитет.

5. Использование иммуномодуляторов, но особенно липопептида, через семь месяцев после вакцинации способствует сохранению более высоких, по сравнению с только вакцинированными животными, титров противохолерных антител в сыворотке крови взрослых кроликов, что свидетельствует о стимулирующем влиянии препаратов на иммуногенную активность противохолерной вакцины.

6. У вакцинированных животных, получавших полиоксидоний, деринат и липопептид регистрируется увеличение количества антителообразующих клеток в пейеровых бляшках, а также секреторного иммуноглобулина А в тонком кишечнике, что говорит о положительном действии иммуномодуляторов на гуморальное звено местного поствакцинального противохолерного иммунитета.

7. Введение полиоксидония, дерината и липопептида при вакцинации способствует повышению протективных свойств антигенов, входящих в состав холерной вакцины, но в

разной степени, что может быть обусловлено особенностями структуры этих иммуномодуляторов и механизма их действия.

8. Использование иммуномодуляторов, особенно липоида, позволяет снизить рекомендуемую дозу противохолерной вакцины, что способствует уменьшению антигенной нагрузки на макроорганизм при сохранении защитной эффективности профилактического препарата.

9. Применение липоида предотвращает развитие экспериментальной холеры у всех опытных белых мышей и взрослых кроликов через месяц после прививки, в том числе и при снижении вакцинирующей дозы, а также в три раза повышает протективность противохолерной вакцины через семь месяцев поствакцинального периода, что свидетельствует о его наибольшей, по сравнению с другими изученными препаратами, способности увеличивать защитные свойства вакцины холерной бивалентной химической.

10. Полиоксидоний, деринат, и липоид способствуют усилению иммуогенных и протективных свойств противохолерной вакцины в первый месяц поствакцинального периода, а также увеличению, особенно под влиянием липоида, напряженности противохолерного иммунитета через семь месяцев после прививки, что свидетельствует о перспективности и целесообразности их использования для повышения эффективности специфической профилактики холеры.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Оригинальные статьи

1. **Филиппенко А.В.**, Омельченко Н.Д., Иванова И.А., Беспалова И.А., Дорошенко Е.П., Галичева А.Л. Некоторые аспекты неспецифической профилактики и лечения особо опасных инфекций // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2015, № 5. - С. 111-116.

2. Омельченко Н.Д., Иванова И.А., Беспалова И.А., **Филиппенко А.В.** Иммуномодуляторы и специфическая профилактика инфекционных болезней // Проблемы особо опасных инфекций. - 2017. - Вып. 3 – С. 21-26.

3. Беспалова И.А., Иванова И.А., Омельченко Н.Д., **Филиппенко А.В.**, Труфанова А.А. Современное состояние специфической профилактики холеры // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2018. - № 1. – С. 55-61.

4. **Филиппенко А.В.**, Иванова И.А., Омельченко Н.Д., Пасюкова Н.И., Беспалова И.А., Труфанова А.А. Совершенствование специфической профилактики холеры с помощью иммуномодуляторов // Медицинская иммунология. – 2021. – Т. 23(4). – С. 915-920. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-IOS-2248>

5. **Филиппенко А.В.**, Иванова И.А., Омельченко Н.Д., Труфанова А.А. Влияние иммуномодуляторов на формирование поствакцинального противохолерного иммунитета // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2022. - Т. 99. - №1. - С. 81-92. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-188>

6. **Филиппенко А.В.**, Иванова И.А., Омельченко Н.Д., Труфанова А.А. Оценка экспрессии поверхностных маркеров активации лимфоцитов и продукции секреторного иммуноглобулина А в процессе формирования противохолерного иммунитета // Иммунопатология, аллергология, инфектология. - 2022. - №4. - С.62-68. DOI: 10.14427/jirai.2022.4.62

7. **Филиппенко А.В.**, Труфанова А.А., Иванова И.А., Омельченко Н.Д. Основные группы адьювантов и перспективы их использования для специфической профилактики особо опасных и других инфекционных болезней // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2023. - Т. 100. - №3. - С. 237-246. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-339>

Патенты

Филиппенко А.В., Иванова И.А., Омельченко Н.Д., Беспалова И.А., Труфанова А.А. Способ повышения эффективности противохолерной вакцинации в эксперименте // Патент на изобретение № 2691411 от 30.06.2019г. Патентообладатель: «Федеральное казенное учреждение здравоохранения "Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека» - Заявлено 25.09. 2018. - Заявка RU2018133928А. – Оpubл. 13.06.2019 Бюл. № 17 – 10 с.