

DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-71-77

УДК 616.98:579.842.23

А.Ю. Гончарова, С.А. Бугоркова, О.М. Кудрявцева, В.А. Кожевников, А.Л. Кравцов,
Т.Н. Каштанова, Т.Н. Щуковская

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ВАКЦИННОГО ШТАММА *YERSINIA PESTIS* EV НИИЭГ В СОЧЕТАНИИ С ИММУНОМОДУЛЯТОРАМИ

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

Цель работы – провести сравнительную оценку иммуномодулирующего эффекта сочетанного применения вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ с препаратами «Полиоксидоний» и «Ингарон» на модели мышей линии BALB/c. **Материалы и методы.** Мышей линии BALB/c подкожно иммунизировали культурой *Yersinia pestis* EV НИИЭГ в дозе $2,5 \cdot 10^4$ м.к. (1 группа), в сочетании с ингароном в дозе 150 МЕ (2 группа) или с полиоксидонием в дозе 4 мкг (3 группа), 4 группа – интактные мыши. На 3, 7, 21 и 90-е сутки после иммунизации оценивали субпопуляционный состав лимфоцитов, продукцию медиаторов клеточного ответа (INF- γ и IL-10), титры специфических антител к капсульному антигену чумного микроба (F1), ядерный аппарат лимфоцитов, а также характер гистологических изменений в органах мышей. Характеристику иммуногенной (протективной) активности сочетанного применения *Y. pestis* EV НИИЭГ с иммуномодуляторами в отношении *Y. pestis* 231 в опытах на мышах линии BALB/c проводили на 21-е сутки после иммунизации, определяя количество павших животных и их среднюю продолжительность жизни. **Результаты и обсуждение.** Сочетанное введение экспериментальным животным вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ с полиоксидонием или ингароном позволило установить различия в реакции иммунной системы биомодели, обусловленные механизмом действия конкретного иммуномодулятора. Установлено, что как полиоксидоний, так и ингарон при сочетанном использовании с *Y. pestis* EV НИИЭГ усиливают у экспериментальных животных реакцию со стороны иммунокомпетентных клеток, способствуют активации гуморального ответа и продукции медиаторов клеточного ответа, не оказывают повреждающего действия на ткани макроорганизма. В то же время эффективность применения сочетанной вакцинации *Y. pestis* EV НИИЭГ с иммуномодуляторами в тесте заражения мышей подтверждена только для полиоксидония.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, вакцинный штамм чумного микроба, иммуномодуляторы, иммуногенность, протективность.

Корреспондирующий автор: Гончарова Анастасия Юрьевна, e-mail: rusrap@microbe.ru.

Для цитирования: Гончарова А.Ю., Бугоркова С.А., Кудрявцева О.М., Кожевников В.А., Кравцов А.Л., Каштанова Т.Н., Щуковская Т.Н. Экспериментальная оценка эффективности применения вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ в сочетании с иммуномодуляторами. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 2:71–77. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-71-77

Поступила 14.04.19. Отправлена на доработку 15.06.19. Принята к публ. 21.11.19.

A.Yu. Goncharova, S.A. Bugorkova, O.M. Kudryavtseva, V.A. Kozhevnikov, A.L. Kravtsov,
T.N. Kashtanova, T.N. Shchukovskaya

Experimental Evaluation of Application of the Vaccine Strain *Yersinia pestis* EV NIEG in Combination with Immune-Modulators

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe” of the Rosпотребнадзор, Saratov, Russian Federation

Abstract. Objective of the work was to conduct a comparative assessment of the immune-modulating effect of the combined use of *Yersinia pestis* EV NIEG vaccine strain with Polyoxidonium and Ingaron preparations on a BALB/c mouse model. **Materials and methods.** Mice of the BALB/c line were immunized subcutaneously with *Yersinia pestis* EV NIEG culture at a dose of $2.5 \cdot 10^4$ m.c. (1st group), in combination with Ingaron at a dose of 150 IU (2nd group) or with Polyoxidonium at a dose of 4 μ g (3rd group), the 4th group is intact mice. On days 3, 7, 21 and 90 after immunization, the subpopulation composition of lymphocytes, the production of mediators of the cellular response (INF- γ and IL-10), the titers of specific antibodies to the capsular antigen of plague microbe (F1), the nuclear apparatus of lymphocytes, and the nature of histological changes in the organs of mice were determined. Characterization of immunogenic (protective) activity of the combined use of *Y. pestis* EV NIEG with immune-modulators against *Y. pestis* 231 in experiments on BALB/c mice was performed on the 21st day after immunization through determining the number of dead animals and their average life expectancy. **Results and discussion.** The combined administration of *Y. pestis* EV NIEG vaccine strain with Polyoxidonium or Ingaron to experimental animals allowed us to establish differences in the response of the immune system of biomodels, due to the mechanism of action of a specific immune-modulator. It has been established that both Polyoxidonium and Ingaron combined with *Y. pestis* EV NIEG enhance the response of immune-competent cells in experimental animals, contribute to the activation of the humoral response and the production of mediators of the cellular response, do not have a damaging effect on the tissue of the macroorganism. At the same time, the efficacy of using combined vaccination of *Y. pestis* EV NIEG with immune-modulators in the inoculation test is confirmed for Polyoxidonium only.

Keywords: *Yersinia pestis*, vaccine strain of plague microbe, immune-modulators, immunogenicity, protectivity.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Anastasiya Yu. Goncharova, e-mail: rusrap@microbe.ru.

Citation: Goncharova A.Yu., Bugorkova S.A., Kudryavtseva O.M., Kozhevnikov V.A., Kravtsov A.L., Kashtanova T.N., Shchukovskaya T.N. Experimental Evaluation of Application of the Vaccine Strain *Yersinia pestis* EV NIEG in Combination with Immune-Modulators. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; 2:71–77. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-71-77

Received 14.04.19. Revised 15.06.19. Accepted 21.11.19.

Одной из возможностей для повышения эффективности иммунопрофилактики чумы остается поиск средств, потенцирующих специфический иммунный ответ при применении вакцины чумной живой (ВЧЖ). Для этого предлагается включение в схемы иммунизации веществ, направленно стимулирующих то или иное звено иммунного ответа [1–3].

Современные иммуномодуляторы – вещества, обладающие различными механизмами стимуляции иммунного ответа, не вызывающие аллергических, токсических и иных побочных реакций, широко используются для форсификации иммунного ответа. Для сочетанного применения с ВЧЖ определенный интерес представляют такие препараты, как азоксимера бромид «Полиоксидоний» и интерферон-гамма «Ингарон», успешно применяемые с рядом других вакцин [4–6]. Синтетический полиэлектrolит – полиоксидоний (ПО) – оказывает стимулирующее действие на неспецифическую резистентность организма, активизирует все звенья фагоцитарного процесса, гуморальный и клеточный иммунный ответ [4]. Препараты, содержащие интерферон, например «Ингарон» (рекомбинантный человеческий интерферон-гамма), активируют макрофаги, нейтрофилы, естественные киллерные клетки и цитотоксические Т-лимфоциты и используются в схемах сочетанной профилактики гриппа [7], для повышения иммуногенности противоопухолевых вакцин [8]. Если положительный результат от моделирования сочетанного введения ПО с *Yersinia pestis* EV НИИЭГ описан ранее [9], то препараты интерферона в основном используют в схемах профилактики вирусных инфекций [10] и опыт их применения при вакцинации против чумы в литературе отсутствует. В то же время от целого ряда медиаторов клеточного ответа (цитокинов), таких как IFN- γ и TNF- α , значимо зависит защитный потенциал макроорганизма при противодействии чумному микробу [11–13].

Цель работы – провести сравнительную оценку иммуномодулирующего эффекта сочетанного применения вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ с препаратами «Полиоксидоний» и «Ингарон» на модели мышей линии BALB/c.

Материалы и методы

Штаммы. В работе использовали вакцинный штамм *Y. pestis* EV линии НИИЭГ и вирулентный штамм *Y. pestis* 231 (708) основного подвида, полученные из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Саратов.

Питательные среды. Культуры штаммов выращивали на агаре Хоттингера pH (7,2 \pm 0,1) (производство ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»). Из выросшей культуры по стандартному образцу мутности ОСО 42-28-59-85П 10 единиц, эквивалентному 1 \cdot 10⁹ м.к./мл готовили взвесь чумного микроба в стерильном 0,9 % растворе натрия хлорида pH 7,2. Методом серийных разведений конечную концентрацию клеток доводили до необходимой.

Иммуномодулирующие препараты. Полиоксидоний (НПО «ПетроваксФарм», Россия) и ингарон (НПП «Фармаклон», Россия).

Лабораторные животные. Эксперименты проводили на белых мышах линии BALB/c массой от (18,5 \pm 1,5) г. В работе использовали здоровых животных, полученных из питомника ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Мышей выдерживали на стандартном рационе с достаточным количеством воды в течение 10 дней. Дальнейшие эксперименты на животных проводили в соответствии с Директивой № 2010/63/ЕС Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22.09.2010 г. «О защите животных, используемых для научных целей».

Иммунизация. Животных (240 особей) подкожно иммунизировали двухсуточной агаровой культурой вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ (1-я группа), в сочетании с ингароном (2-я группа) или ПО (3-я группа) в дозах 2 \cdot 10², 1 \cdot 10³, 5 \cdot 10³ и 2,5 \cdot 10⁴ м.к., указанные иммуномодуляторы вводили животным подкожно за 60 мин до иммунизации в дозе 150 МЕ и 4 мкг соответственно [6]. В качестве контроля (4-я группа) взяты интактные мыши. Эвтаназию мышшей, иммунизированных *Y. pestis* EV НИИЭГ в дозе 2,5 \cdot 10⁴ м.к. (по 40 животных из каждой группы), проводили путем цервикальной дислокации на 3, 7, 21 и 90-е сутки иммуногенеза. Для исследования забирали кровь, селезенку, лимфатические узлы, кусочки внутренних органов. На 21-е сутки иммуногенеза оставшихся мышшей (120 особей) подкожно заражали культурой вирулентного штамма основного подвида *Y. pestis* 231 в дозе 400 LD50 в объеме 0,2 мл. Наблюдения за зараженными животными вели в течение 20 сут. Гибель от чумы подтверждали наличием соответствующей патологоанатомической картины, высевок из органов и крови на агар Хоттингера pH (7,2 \pm 0,1) со стимулятором роста (0,024 \pm 0,001) % сульфитом натрия и (0,0045 \pm 0,0005) % генцианвиолетом, а также чумного микроба в мазках-отпечатках из органов павших животных, окрашенных по Граму. Величину ImD50 рассчитывали по методу Кербера в модификации И.П. Ашмарина по формуле:

$$\lg \text{ImD50} = \lg \text{DN} - \Delta (\Sigma \text{Li} - 0,5),$$

где DN – максимальная величина дозы; N – общее число испытанных доз; $\sum Li$ – сумма значений Li , найденных для всех испытанных доз; Δ – логарифм кратности испытанных разведений.

Иммунологические методы. Определение спонтанной и индуцированной продукции цитокинов (INF- γ , IL-10) в крови мышей проводили с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ТИФА) с применением коммерческих тест-систем (BioScience, Австрия) на автоматическом иммуноферментном анализаторе «LAZURIT» (Dynex Technologies, США) при длине волны 450 нм. Для оценки продукции цитокинов венозную кровь с антикоагулянтом (гепарин, ОАО «Синтез», Россия) разводили в соотношении 1:4 средой RPMI 1640 (ПанЭко, Испания), содержащей 100 мкг/мл гентамицина (ФГУП им. Н.А. Семашко, Россия), затем делили на две равные части. В одну часть вносили 100 мкл Т-клеточного митогена конканавалина А (Sigma, США) в конечной концентрации 15 мкг/мл, в другую – 100 мкл физиологического раствора. Образцы инкубировали в течение 24 ч при 37 °C [14]. После инкубации клетки осаждали центрифугированием в стандартных условиях и отбирали супернатанты. Специфические антитела к капсульному антигену чумного микроба (F1) определяли в сыворотке крови экспериментальных животных на 3, 7, 21 и 90-е сутки после иммунизации методом ТИФА с использованием коммерческой тест-системы «ИФА-АТ-Ф1 YERSINIA PESTIS» (производитель ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Россия). Динамику показателей клеточного иммунитета оценивали по изменению относительного содержания субпопуляций лимфоцитов в цельной крови и селезенке, несущих маркеры CD4⁺ (Т-хелперы) и CD8⁺ (цитотоксические Т-лимфоциты), применяя наборы моноклональных антител «RAT ANTI-MOUSE CD4: PE» и «RAT ANTI-MOUSE CD8: FITC» (BD BioSciences, США). Для лизиса эритроцитов в образцах применяли Lising Solution (BD FACS, USA). Фенотипирование клеток осуществляли на проточном цитофлуориметре с 2 источниками излучения и 9 каналами детекции.

Гистологическое исследование. Кусочки внутренних органов фиксировали в 10 % водном нейтральном растворе формалина (НеваРеагент, Россия). Дальнейшую обработку материала проводили по общепринятой стандартной методике, готовые полутонкие срезы окрашивали гематоксилином и эозином (Merck, США) [15]. Для выявления активности аффинных к серебру белков в области ядрышкового организатора (AgNOR) полутонкие срезы лимфоидных органов окрашивали по методу W.M. Howell и D.A. Black [16] с использованием готового набора реактивов фирмы BioVitrum. Микроскопическое исследование гистологических препаратов и их фотодокументирование выполняли с помощью микроскопа Olympus CX41 (Olympus, Япония) и цифровой камеры VZ-C31S (VideoZavr, Россия) в программе VideoZavr (версия 1.5).

Статистические методы. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием стандартного пакета программ Microsoft Office Excel 2010 и «Statistica 10.0» (StatSoft Inc.). Достоверность различий показателей в исследуемых группах оценивали по t-критерию Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Поствакцинальный иммунитет характеризуют с использованием различных методических подходов, основанных на оценке процессов активации лимфоцитов, что может выражаться в субпопуляционных сдвигах клеток, в повышении или понижении ими продукции биологически активных регуляторов – цитокинов [17] и/или изменении процессов репликации в ядрах этих клеток [18, 19]. Ряд цитокинов являются биомаркерами для характеристики противочумного иммунного ответа и ассоциированы с Th1- (INF- γ , TNF- α) или Th2- (IL-4, IL-10) клетками иммунной системы [12]. Установлено усиление спонтанной и индуцированной продукции исследуемых цитокинов (INF- γ , IL-10) у мышей во всех опытных группах по сравнению с группой контроля, но динамика процесса активации клеток при этом имела свои особенности (табл. 1).

Если уровень спонтанной продукции INF- γ в различные сроки наблюдения у мышей в 1-й и 3-й группах не имел достоверного отличия, то у животных из 2-й группы до 7-х суток отмечали более высокую концентрацию указанного цитокина, но в последующий период происходило выравнивание показателей во всех опытных группах.

Аналогичная тенденция сохранялась и для показателей индуцированной продукции INF- γ , но если в 1-й и 3-й группах к 90-м суткам наблюдения уровень индуцированной продукции указанного цитокина был близок к показателям для мышей из группы контроля, то во 2-й группе продолжали регистрировать достоверное повышение индуцированной продукции INF- γ до 90-х суток.

Спонтанная продукция IL-10 была максимальной во все периоды наблюдения у мышей в 3-й группе. Если до 7-х суток достоверного отличия между показателями спонтанной продукции указанного цитокина у животных из 1-й и 2-й групп не наблюдали, то с 7-х и до 21-х суток концентрация IL-10 у мышей 2-й группы была близка к показателям у животных из 3-й группы. При этом у животных 3-й группы высокий уровень спонтанной продукции IL-10 сохранялся до 90-х суток и в 3 раза кратно превышал аналогичные значения показателя в группе контроля, а у мышей из 1-й и 2-й групп в этот период уже не регистрировали достоверного отличия по указанному показателю с группой контроля. Аналогичная тенденция была характерна и для индуцированной продукции IL-10. Причем в 3-й группе индуцирован-

Таблица 1 / Table 1

Субпопуляционная характеристика Т-лимфоцитов и медиаторов клеточного ответа (INF- γ , IL-10) у иммунизированных мышей линии BALB/c Me (Q1–Q3)Subpopulation characteristics of T-lymphocytes and mediators of cellular response (INF- γ , IL-10) in immunized mice of BALB/c line Me (Q1–Q3)

Группа Group	Срок (сутки) Timeline (days)	INF- γ , пг/мл (pg/ml)		IL-10, пг/мл (pg/ml)		Т-хелперы (CD4+) T-helpers (CD4+)		Цитотоксические Т-лимфоциты (CD8+) Cytotoxic T-lymphocytes (CD8+)		ИРИ кровь/селезенка НП blood/spleen
		Sp	Ind	Sp	Ind	Кровь Blood	Селезенка Spleen	Кровь Blood	Селезенка Spleen	
1 n=40	3	57,1* (53,0–63,5)	80,6* (67,6–90,6)	32,2* (27,2–35,5)	36,9* (29,9–40,7)	34,9* (33,1–39,4)	22,0 (20,1–23,9)	9,3 (9–9,5)	7,5 (6,6–8,5)	3,7/2,9
	7	62,5* (59,5–71,0)	75,5* (69,2–79,3)	30,1* (24,9–33,1)	34,3* (29,1–40,7)	33,3* (32–34,3)	20,5 (19,4–22,7)	8,9 (7,9–9,6)	8,3 (7,0–9,2)	3,7/2,5
	21	54,6* (48,7–59,4)	63,2* (58,7–66,0)	17,7 (14,0–19,8)	22,9 (19,6–24,7)	38,4 (37,1–39,6)	22,0 (20–22,7)	9,9 (8,9–10,8)	8,0 (7,5–8,8)	3,9/2,7
	90	33,4 (29,9–34,7)	47,4 (45,7–48,3)	10,8 (10,0–11,1)	12,4 (10,6–13,2)	33,5* (31,3–35,0)	19,8 (16–21,5)	9,3 (9,1–10,0)	7,8 (6,9–8,6)	3,6/2,5
2 n=40	3	79,1* (71,6–94,7)	107,9* (99,3–117,4)	39,5* (30,8–60,4)	48,2* (33,9–62,4)	43,1 (39,0–50,0)	18,5 (18,0–18,7)	14,4* (13,1–14,5)	7,0 (6,6–7,9)	3,0/2,6
	7	88,2* (76,2–100,6)	102,1* (82,1–113,9)	50,33* (44,4–66,7)	75,5* (64,0–104,7)	42,1 (39,5–48,8)	17,8 (17,0–18,8)	14,5* (13,2–16,6)	6,7 (6,4–6,9)	2,9/2,6
	21	60,2* (42,2–68,7)	96,7* (70,5–107,0)	51,1* (44,4–63,1)	55,6* (48,9–74,0)	43,7 (43,1–44,8)	20,3 (18,4–22,3)	13,4* (12,9–14,3)	7,1 (6,1–7,6)	3,2/2,8
	90	52,1* (32,4–64,5)	60,3* (56,4–71,0)	17,7 (13,8–19,3)	22,3 (18,5–24,2)	40,4 (40,1–40,8)	18,4 (18,2–19)	11,3 (10,0–11,6)	8,7 (6,4–9,0)	3,5/2,1
3 n=40	3	58,1* (52,8–61,6)	71,7* (66,7–76,8)	64,5* (58,6–73,3)	89,4* (78,6–106,8)	33,8* (31,1–36,8)	21,5 (20,7–22,0)	7,7* (6,8–8,7)	7,9 (7,3–8,4)	4,4*/2,7
	7	64,1* (58,5–70,5)	67,7* (65,6–73,9)	69,1* (61,7–75,3)	74,2* (69,7–84,2)	33,6 (29,8–50,6)	22,7 (21,0–24,7)	7,9* (7,0–8,5)	9,1 (7,9–0,2)	4,3*/2,5
	21	47,9* (46,4–49,6)	68,2* (65,3–69,8)	59,2* (48,9–62,8)	64,3* (51,5–70,4)	39,9 (37,0–42,9)	24,7* (22,6–25,2)	8,0* (7,1–9,0)	9,5 (7,7–10,0)	5,0*/2,4
	90	40,2 (39,4–41,7)	56,6 (54,2–59,9)	34,6* (32,3–37,2)	55,3* (51,2–58,9)	41,2 (39,8–44,0)	23,0 (21,0–25,1)	8,5 (8,1–9,3)	9,6 (7,9–9,9)	4,8*/2,6
4 n=40		28,2 (21,3–35,2)	42,6 (23,5–54,7)	11,2 (8,8–11,5)	15,4 (11,8–16,2)	42,0 (40,4–44,0)	18,3 (15,4–21,0)	10,9 (9,5–12,0)	7,3 (6,4–8,0)	3,8/2,5

Примечание: Sp – спонтанная продукция; Ind – индуцированная продукция.

*p < 0,05 по сравнению с 4 группой.

Note: Sp – spontaneous production; Ind – induced production.

*p < 0,05 as compared to group 4.

ная продукция указанного цитокина во все периоды наблюдения в среднем в 5,5–3,6 раза превышала аналогичный показатель у животных из группы контроля. Полученные нами *in vivo* результаты вполне согласуются с данными, зарегистрированными ранее при оценке *in vitro* спонтанной и индуцированной ПО продукции цитокинов клетками крови людей, вакцинированных против чумы [14]. Результат сравнительного анализа используемых схем иммунизации выявил преимущества препарата «Ингарон» по стимуляции спонтанной и индуцированной продукции INF- γ . В целом отмечали более выраженную активацию клеток, сопровождающуюся нарастанием продукции цитокинов, во 2-й и 3-й группах, что косвенно подтверждает факт стимуляции иммунного ответа при сочетанном введении *Y. pestis* EV НИИЭГ с иммуномодуляторами [17].

Другим показателем клеточной активации, а именно пролиферативной активности лимфоцитов на молекулярном уровне, может быть оценка процессов репликации в ядрах этих клеток на фоне вакцина-

ции. При иммунизации мышей *Y. pestis* EV НИИЭГ и *Y. pestis* EV НИИЭГ в сочетании с иммуномодуляторами (ПО, ингарон) на 21-е сутки регистрировали относительное увеличение среднего диаметра лимфоцитов в лимфатических фолликулах лимфоидных органов. У всех животных опытных групп в селезенке и лимфатических узлах отмечали увеличение среднего показателя количества AgNOR-позитивных ядрышек в ядрах клеток соответственно в среднем в 1,3–1,7 раза выше, чем у интактных мышей, но достоверного отличия по этому показателю между опытными группами не выявлено.

Динамику клеточно-опосредованного иммунитета в крови и спленоцитах вакцинированных мышей оценивали по изменению соотношения субпопуляций клеток (CD4+, CD8+). Результаты иммунофенотипирования лимфоцитов при введении *Y. pestis* EV НИИЭГ в сочетании с иммуномодуляторами и без них представлены в табл. 1.

Изменение количества лимфоцитов с фенотипом CD4+ и CD8+ в крови и селезенке у животных опыт-

ных групп имело свои особенности. Если у мышей из 1-й и 3-й групп количество CD4⁺ клеток в крови снижалось по отношению к показателям в группе контроля, то в селезенке клеток с таким фенотипом в этих группах было несколько выше, чем у интактных мышей. В то же время увеличение в крови мышей 2-й группы количества CD4⁺ во все сроки наблюдения проходило на фоне снижения их числа в селезенке. Увеличение количества клеток с фенотипом CD8⁺ в крови мышей из 2-й группы протекало без изменения их числа в селезенке. Начиная с 7-х суток после иммунизации, некоторое уменьшение, по отношению к показателям у мышей из группы контроля, количества CD8⁺ клеток в крови животных 1-й и 3-й групп приводило к относительной активации клеток с фенотипом CD8⁺ в селезенке. Выявленное перераспределение субпопуляционного состава клеток в крови и селезенке иммунизированных мышей в динамике иммуногенеза отражает характер и направленность иммунных реакций. В то же время во всех опытных группах не отмечали существенного изменения иммунорегуляторного индекса (CD4⁺/CD8⁺) для клеток селезенки и напротив – регистрировали увеличение этого показателя для клеток крови у мышей из 3-й группы.

Для сравнения выраженности гуморального ответа на введение только вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ и в сочетании с иммуномодуляторами у мышей оценивали на 21-е сутки после иммунизации продукцию антител к капсульному антигену (F1) чумного микроба. Во всех полученных сыворотках от иммунизированных животных выявляли антитела к F1, уровень которых превышал титры соответствующих антител у биомоделей из группы контроля. Титры антител к F1 в сыворотке крови биомодели были в 2,4 раза ($p \leq 0,01$) выше у животных 3-й группы (1:320–1:640), по сравнению с мышами из 1-й группы (1:80–1:160). Значимых отличий показателей продукции антител к F1 чумного микроба у животных 1-й и 2-й групп не отмечали.

Сочетанное применение *Y. pestis* EV НИИЭГ с ПО к окончанию эффекторной фазы иммунного ответа (21-е сутки) характеризовали не только высокая продукция специфических антител к F1, но и более выраженная активация спонтанной и индуцированной продукции IL-10, а также увеличение доли популяции CD4⁺ лимфоцитов в селезенке при высоком иммунорегуляторном индексе (ИРИ) для клеток крови. Полученные результаты согласуются с данными других исследователей относительно влияния ПО на эффективность эффекторной фазы иммунного ответа [10]. В то же время сочетанное применение *Y. pestis* EV НИИЭГ с ингароном, напротив, сопровождали выраженная продукция INF- γ и субпопуляционная активация лимфоцитов крови преимущественно за счет CD8⁺ клеток.

При гистологическом исследовании не обнаружено признаков повреждающего действия на клетки

и ткани животных сочетанного введения вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ с иммуномодуляторами и не выявлено значимых отличий в изменении функциональной морфологии иммунокомпетентных органов мышей разных опытных групп.

Зарегистрировав иммуномодулирующий эффект от сочетанного применения *Y. pestis* EV НИИЭГ с ПО и ингароном, на следующем этапе оценили иммуногенную (протективную) активность используемых схем вакцинации мышей по изменению интегрального показателя ImD50 (median immunizing dose), то есть той дозы вакцины, которая обеспечивала бы развитие защитного иммунитета к инфекции у половины опытных животных. При моделировании чумной инфекции на иммунизированных животных установлено, что средняя иммунизирующая доза (ImD50) у мышей в 3-й группе была в 3 раза ($p < 0,05$) ниже, чем в 1-й группе (табл. 2). В то же время у животных из 2-й группы регистрировали увеличение ImD50 в 13 раз ($p < 0,01$) по сравнению с мышами из 1-й группы. Если усиление протективного эффекта сочетанной вакцинации *Y. pestis* EV НИИЭГ с ПО в полной мере совпадает с представленными литературными данными [9, 10], то результат, полученный при сочетанном применении *Y. pestis* EV НИИЭГ и ингарона, возможно, обусловлен как прямым, так и опосредованным воздействием интерферона на живые клетки вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ. Интерферон-гамма стимулирует активность макрофагов и натуральных киллеров, тем самым препятствуя размножению и приживлению микробных клеток в органах и тканях биомодели в период нестерильной фазы становления противочумного иммунитета. Тем не менее выявленный стимулирующий потенциал ингарона на клетки иммунной системы при сочетанном введении с *Y. pestis* EV НИИЭГ позволяет планировать исследования по дальнейшему совершенствованию схем применения этого препарата с ЖЧВ, в частности, как препарата для экстренной профилактики чумы у лиц, ранее привитых живой вакциной, а также с целью пролонгации эффективного специфического противочумного иммунитета.

Таким образом, при сочетанном введении экспериментальным животным вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ с ПО или ингароном регистрировали усиление реакции со стороны иммунокомпетентных клеток, активацию гуморального ответа и продукции медиаторов клеточного ответа, отсутствие повреждающего действия на ткани макроорганизма, но эффективность применения сочетанной вакцинации *Y. pestis* EV НИИЭГ с иммуномодуляторами в тесте заражения мышей подтверждена только для ПО.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Благодарим за оказанную техническую поддержку в экспериментах по заражению экспериментальных животных А.Ф. Курылину

Таблица 2 / Table 2

Иммуногенная (протективная) активность сочетанного применения *Y. pestis* EV НИИЭГ с иммуномодуляторами в отношении *Y. pestis* 231 в опытах на мышах линии BALB/c

Immunogenic (protective) activity of *Y. pestis* EV NIEEG application in combination with immune-modulators in relation to *Y. pestis* 231 in BALB/c mice experiments

Схема иммунизации Immunization schedule	Заражение <i>Y. pestis</i> 231 в дозе Challenging with <i>Y. pestis</i> 231 strain in a dose of	Число животных (павшие/иммунизированные) The number of animals (dead/immunized)	Средняя продолжительность жизни павших животных (сутки) Average lifespan of animals that died (days)	ImD50 KOE/CFU
<i>Y. pestis</i> EV NIEEG (2,0·10 ² KOE/CFU)	400 LD50 (3500 KOE/CFU)	7/9	4,7±0,2	1541 KOE/CFU
<i>Y. pestis</i> EV NIEEG (1,0·10 ³ KOE/CFU)	—	5/9	4,6±0,2	
<i>Y. pestis</i> EV NIEEG (5,0·10 ³ KOE/CFU)	—	3/9	5,1±0,4	
<i>Y. pestis</i> EV NIEEG (2,5·10 ⁴ KOE/CFU)	—	1/10	5,0±0,4	
<i>Y. pestis</i> EV NIEEG (2,0·10 ² KOE/CFU + Ingaron)	—	10/10	4,9±0,4	20137 KOE/CFU
<i>Y. pestis</i> EV NIEEG (1,0·10 ³ KOE + Ingaron)	—	9/10	4,5±0,3	
<i>Y. pestis</i> EV NIEEG (5,0·10 ³ KOE + Ingaron)	—	8/10	5,0±0,43	
<i>Y. pestis</i> EV NIEEG (2,5·10 ⁴ KOE + Ingaron)	—	6/9	5,5±0,4	
<i>Y. pestis</i> EV NIEEG (2,0·10 ² KOE + Polyoxidonium)	—	4/10	7,6±2,2	520 KOE/CFU
<i>Y. pestis</i> EV NIEEG (1,0·10 ³ KOE + Polyoxidonium)	—	2/10	11,2±2,6	
<i>Y. pestis</i> EV NIEEG (5,0·10 ³ KOE + Polyoxidonium)	—	0/10	-	
<i>Y. pestis</i> EV NIEEG (2,5·10 ⁴ KOE + Polyoxidonium)	—	0/10	-	
Физиологический раствор Physiological solution	400 LD50	10/10	3,7±0,5	-
Физиологический раствор Physiological solution	10 LD50	10/10	4,6±0,7	-

Список литературы

- Костинова М.П., Соловьева И.Л., редакторы. Иммуномодуляторы и вакцинация. М.: 4Мпресс; 2013. 272 с.
- Пономарева Т.С., Дерябин П.Н., Тугамбаев Т.И., Мельникова Н.Н., Адамбеков Д.А. Иммуномодуляция, как способ повышения иммуногенности живой чумной вакцины. *Вестник КГМА им. И.К. Ахунбаева*. 2015; 3:95–7.
- Богачева Н.В., Охупкина В.Ю., Пяткова Н.В., Федотов А.К., Кучеренко А.С. Экспериментальное изучение влияния иммуномодуляторов на эффективность применения вакцины бруцеллезной живой сухой. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2016; 15(2):84–92. DOI: 10.31631/2073-3046-2016-15-2-84-92.
- Пинегин Б.В., Некрасов А.В., Хайтов Р.М. Иммуномодулятор полиоксидоний: механизмы действия и аспекты клинического применения. *Цитокины и воспаление*. 2004; 3(3):41–7.
- Караулов А.В., Евсегнеева И.В. Современные подходы к вакцинопрофилактике гриппа. *Вакцинация*. 2011; 1:43–52.
- Кравцов А.Л., Ключева С.Н., Бугоркова С.А. Влияние иммуномодуляторов на реактивность клеток иммунной системы при моделировании противотуляремийного вакцинного процесса. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2016; 15(3):94–101. DOI: 10.31631/2073-3046-2016-15-3-94-101.
- Киселев О.И., Стукова М.А., Намгаладзе А.Д., Головачева Е.Г., Ерофеева М.К. Способ профилактики гриппа путем сочетанного применения интерферона гамма и инактивированной противогриппозной вакцины. Патент РФ № 2546540, опубл. 10.04.2015 г. Бюл. № 10.
- Манина И.В., Михайлова И.Н., Козлов А.М., Барышников А.Ю. Способ повышения иммуногенности цельноклеточных противоопухолевых вакцин. Патент РФ № 2458120, опубл. 10.08.2012 г. Бюл. № 22.
- Пономарева Т.С., Дерябин П.Н., Каральник Б.В., Тугамбаев Т.И., Атшабар Б.Б., Денисова Т.Г., Закарян С.Б., Мельникова Н.Н. Влияние полиоксидония на иммуногенную и протективную активность живой чумной вакцины. *Иммунология*. 2014; 35(5):286–90.
- Верлан Н.В. Использование интерферонов: иммунологические и клинические аспекты. *Цитокины и воспаление*. 2016; 15(1):12–21.
- Amedei A., Nicolai E., Marino L., D'Elia M.M. Role of immune response in *Yersinia pestis* infection. *J. Infect. Dev. Ctries*. 2011; 5(9):628–39. DOI: 10.3855/jidc.1999.
- Williamson E.D. The role of immune correlates

and surrogate markers in the development of vaccines and immunotherapies for plague. *Adv. Prev. Med.* 2012; 2012:365980. DOI: 10.1155/2012/365980.

13. Zhang X., Qi Z., Bi Y., Zhang Q., Tan Y., Yang H., Xin Y., Yang R., Wang X. A live attenuated strain of *Yersinia pestis* ΔyscB provides protection against bubonic and pneumonic plagues in mouse model. *Vaccine*. 2013; 31(22):2539–42. DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.03.054.

14. Ключева С.Н., Щуковская Т.Н. Влияние адъювантов нового поколения *in vitro* на продукцию цитокинов клетками крови вакцинированных против чумы лиц. *Российский иммунологический журнал*. 2015; 9(2):201–208.

15. Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники. СПб.: ООО «Издательство СпецЛит»; 2010. 95 с.

16. Howell W.M., Black D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*. 1980; 36:1014–5. DOI: 10.1007/BF01953855.

17. Хайтов Р.М. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2006. 255 с.

18. Crocker J., Nar P. Nucleolar organizer regions in lymphomas. *J. Pathol.* 1987; 151:111–8. DOI: 10.1002/path.1711510203.

19. Бугоркова С.А., Щуковская Т.Н., Курылина А.Ф. Ядрышкообразный аппарат лимфоцитов как индикатор функциональной активности лимфоидных органов при доклинической оценке вакцин. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015; 2:75–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-2-75-78.

References

- Kostinova M.P., Solov'eva I.L., editors. Immunomodulators and Vaccination. M.: 4Mpress; 2013. 272p.
- Ponomareva T.S., Deryabin P.N., Tugambaev T.I., Mel'nikova N.N., Adambekov D.A. Immunomodulation as a way to increase the immunogenicity of live plague vaccine. *Vestnik KGMA im. I.K. Akhunbaeva [Bulletin of the KSGMA named after I.K. Akhunbaeva]*. 2015; 3:95–7.
- Bogacheva N.V., Okhapkina V.Yu., Pyatkova N.V., Fedotov A.K., Kucherenko A.S. Experimental study of the effect of immunomodulators on the efficacy of a live dry brucella vaccine application. *Epidemiologiya i Vaksino profilaktika [Epidemiology and Vaccinal Prevention]*. 2016; 15(2):84–92. DOI: 10.31631/2073-3046-2016-15-2-84-92.
- Pinegin B.V., Nekrasov A.V., Khaitov R.M. Polyoxidonium

immunomodulator: mechanisms of action and aspects of clinical use. *Tsitokiny i Vospalenie [Cytokines and Inflammation]*. 2004; 3:41–7.

5. Karaulov A.V., Evsegneeva I.V. Modern approaches to vaccine prevention of influenza. *Vaktsinatsiya [Vaccination]*. 2011; 1(1):43–52.

6. Kravtsov A.L., Klyueva S.N., Bugorkova S.A. The effect of immunomodulators on the reactivity of immune system cells in the simulation of anti-tularemia vaccine process. *Epidemiologiya i Vaktsinoprofilaktika [Epidemiology and Vaccinal Prevention]*. 2016; 15(3):94–101. DOI: 10.31631/2073-3046-2016-15-3-94-101.

7. Kiselev O.I., Stukova M.A., Namgaladze A.D., Golovacheva E.G., Erofeeva M.K. A method of preventing influenza by the combined use of interferon gamma and inactivated influenza vaccine. RF patent No 2546540. Publ. 04/10/2015 Bul No. 10.

8. Manina I.V., Mikhailova I.N., Kozlov A.M., Baryshnikov A.Yu. A method for increasing the immunogenicity of whole cell cancer vaccines. The patent of the Russian Federation № 2458120. Publ. 08/10/2012. Bul №22.

9. Ponomareva T.S., Deryabin P.N., Karal'nik B.V., Tugambaev T.I., Atshabar B.B., Denisova T.G., Zakaryan S.B., Mel'nikova N.N. The effect of polyoxidonium on the immunogenic and protective activity of live plague vaccine. *Immunologiya [Immunology]*. 2014; 35(5):286–90.

10. Verlan N. V. Interferon usage: immunological and clinical aspects. *Tsitokiny i Vospalenie [Cytokines and Inflammation]*. 2016; 15(1):12–21.

11. Amedei A., Niccolai E., Marino L., D'Elia M.M. Role of immune response in *Yersinia pestis* infection. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2011; 5(9):628–39. DOI: 10.3855/jidc.1999.

12. Williamson E.D. The role of immune correlates and surrogate markers in the development of vaccines and immunotherapies for plague. *Adv. Prev. Med.* 2012; 2012:365980. DOI: 10.1155/2012/365980.

13. Zhang X., Qi Z., Du Z., Bi Y., Zhang Q., Tan Y., Yang H., Xin Y., Yang R., Wang X. A live attenuated strain of *Yersinia pestis* ΔyscB provides protection against bubonic and pneumonic plagues in mouse model. *Vaccine*. 2013; 31(22):2539–42. DOI: 10.1016/j.

vaccine.2013.03.054.

14. Klyueva S.N., Shchukovskaya T.N. The influence of new-generation adjuvants *in vitro* on the production of cytokines by blood cells of the vaccinated against plague individuals. *Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal [Russian Immunological Journal]*. 2015; 9(2):201–208.

15. Korzhevsky D.E., Gilyarov A.V. Fundamentals of histological technology. St. Petersburg: Publishing House SpetsLit LLC; 2010. 95 p.

16. Howell W.M., Black D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*. 1980; 36:1014–5. DOI: 10.1007/BF01953855.

17. Khaitov R.M. Immunology. M.: GEOTAR-Media; 2006. 255 p.

18. Crocker J., Nar P. Nucleolar organizer regions in lymphomas. *J. Pathol.* 1987; 151:111–8. DOI: 10.1002/path.1711510203.

19. Bugorkova S.A., Shchukovskaya T.N., Kurylina A.F. The nucleoli apparatus of lymphocytes as an indicator of the functional activity of lymphoid organs in the preclinical evaluation of vaccines. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2015; 2:75–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-2-75-78.

Authors:

Goncharova A.Yu., Bugorkova S.A., Kudryavtseva O.M., Kozhevnikov V.A., Kravtsov A.L., Kashtanova T.N., Shchukovskaya T.N. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Гончарова А.Ю., Бугоркова С.А., Кудрявцева О.М., Кожевников В.А., Кравцов А.Л., Каштанова Т.Н., Щуковская Т.Н. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.