

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

На правах рукописи



ФИЛИППЕНКО АННА ВЛАДИМИРОВНА

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

3.2.7. Иммунология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
к.б.н. Иванова И.А.

Ростов-на-Дону-2023

Содержание

Введение	5
Глава 1 Обзор данных литературы	16
1.1 Использование адъювантов при вакцинации против инфекционных болезней	16
1.2 Совершенствование специфической профилактики особо опасных инфекций с помощью иммуноадъювантов	26
1.3 Специфическая профилактика холеры и способы ее совершенствования	31
Глава 2 Материалы и методы исследований	45
2.1 Бактериальные штаммы	45
2.2 Материалы	45
2.2.1 Экспериментальные животные	45
2.2.2 Иммунопрепараты	46
2.3 Методы	46
2.3.1 Иммунизация животных	46
2.3.2 Введение иммуномодуляторов	47
2.3.3 Оценка эффективности сочетанного применения иммуномодуляторов и противохолерной вакцины	47
2.3.4 Получение лимфоцитов	48
2.3.5 Определение популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов	49
2.3.6 Определение профиля цитокинов	49
2.3.7 Определение поверхностных маркеров активации лимфоцитов	50
2.3.8 Определение общего количества антителообразующих клеток пейеровых бляшек	51
2.3.9 Определение количества секреторного иммуноглобулина А	51
2.3.10 Определение общего пула противохолерных антител	52

2.3.11	Моделирование холеры на экспериментальных животных	53
	Метод получения генерализованной инфекции на белых мышах	53
	Модель изолированной петли тонкого кишечника взрослого кролика	53
2.3.12	Статистическая обработка результатов исследований	54
Глава 3	Результаты собственных исследований	55
3.1	Изучение влияния полиоксидония, ликопида, дерината на иммуногенную активность вакцины таблетированной холерной бивалентной химической	55
3.1.1	Влияние иммуномодуляторов на популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов вакцинированных животных	55
3.1.2	Изучение продукции цитокинов иммунокомпетентными клетками периферической крови вакцинированных белых мышей и оценка влияния иммуномодуляторов на этот процесс	63
3.1.3	Оценка экспрессии поверхностных маркеров активации лимфоцитов у вакцинированных животных	66
3.1.4	Изучение влияния иммуномодуляторов на количество антителообразующих клеток в процессе формирования противохолерного иммунитета	74
3.1.5	Влияние иммуномодуляторов на продукцию секреторного иммуноглобулина А в кишечнике вакцинированных мышей	75
3.1.6	Влияние иммуномодуляторов на синтез противохолерных иммуноглобулинов в сыворотке крови вакцинированных взрослых кроликов	77
3.2	Изучение влияния полиоксидония, ликопида, дерината на протективную активность вакцины холерной бивалентной химической таблетированной	80

3.2.1	Оценка действия полиоксидония, ликопида, дерината на протективность противохолерной вакцины на модели взрослых кроликов	80
3.2.2	Оценка влияния полиоксидония, ликопида, дерината на протективную активность противохолерной вакцины на модели генерализованной формы холеры у белых мышей	84
Глава 4	Обсуждение результатов собственных исследований	87
	Заключение	101
	Выводы	103
	Список сокращений	106
	Список использованной литературы	108

Актуальность проблемы

Вакцинация населения с целью защиты от различных патогенов и предотвращения развития иммунопатологических процессов является актуальной проблемой современной медицины. Вакцины вызывают как активацию, так и супрессию отдельных иммунных функций, а вакцинация лиц с нарушениями иммунного статуса может их усугубить и быть неэффективной [Симбирцев и др., 2011]. Вакцинация в отдельных случаях способна подавлять неспецифическую антиинфекционную резистентность, вследствие чего могут происходить обострения латентно протекающих процессов и хронических инфекций [Медуницын, 2001]. Поэтому ведется активный поиск препаратов (адьювантов, иммуномодуляторов) 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 [Симбирцев и др., 2011; Алпатова и др., 2020; Meyer, Zepp, 2022].

Для развития полноценного иммунного ответа на вакцины с успехом применяются препараты цитокинов и различных иммуномодуляторов.

В практической медицине уже используется несколько вакцин, в составе которых присутствуют иммуномодуляторы. Полиоксидоний включен в поливакцину для терапии и профилактики хронической герпетической инфекции, вызванной вирусами простого герпеса 1 и 2 групп. Другая поливакцина против простого герпеса под названием «Витагерпавак» содержит гиалуронат натрия [Пинегин, Латышева, 2001; Баринский и др., 2014]. Для профилактики гриппа, в том числе у детей с 6-месячного возраста, используется субъединичная гриппозная вакцина «Гриппол» с полиоксидонием [Пинегин, Латышева, 2001]. В 2018 г. в России была зарегистрирована новая четырехвалентная гриппозная вакцина группы «Гриппол» – «Гриппол® Квадривалент» также с полиоксидонием в качестве адьюванта. В ходе различных клинических испытаний отмечено, что

использование полиоксидония как адъюванта позволяет снизить риск развития нежелательных реакций у вакцинированных, уменьшить дозы вирусных антигенов, при этом увеличивая их иммуногенность [Караулов и др., 2019]. В ходе клинических исследований доказана эффективность и безопасность вакцины «Гриппол» для лиц старше 60 лет. Еще одна отечественная вакцина против гриппа с иммуномодулятором совидон – «Совигрипп» доказала свою безопасность и эффективность и успешно применяется на территории России [Никифорова и др., 2014]. В вакцину против гепатита В, которая разработана для пациентов с хроническими заболеваниями почек, одобрена и разрешена к применению в США и некоторых европейских государствах, входят два адъюванта: гидроокись алюминия и мурамилдипептид [Giannini et al., 2006].

Показано, что включение виферона в комплекс противогриппозной вакцинации способствует раннему формированию специфического иммунитета и снижает частоту и тяжесть заболевания в эпидемический сезон [Чеботарева и др., 2011]. Современные иммуномодуляторы бестим и беталейкин повышают иммунологическую безопасность вакцины «Энджерикс В» против вирусного гепатита В, увеличивая эффективность вакцинации у пациентов с вторичными иммунодефицитами и хроническим инфекционным синдромом [Абрамова и др., 2004]. При оценке влияния препарата тимогена на эффективность и безопасность вакцинации детей против кори и паротита был сделан вывод о том, что назначение иммуномодулятора способствует более интенсивному синтезу специфических антител в ранние сроки. Кроме того, у этой группы не было выявлено патологических реакций на прививку [Харит и др., 2005]. Имеются положительные результаты использования иммуномодуляторов имунофана [Маркова, Чувиров, 2003], миелопида и полиоксидония [Маркова, Харьянова, 2001] при вакцинации против дифтерии у длительно и часто болеющих детей. И в том, и в другом случае отмечено увеличение антителообразования и повышение эффективности вакцинации. При сочетанном применении

миелопида и полиоксидония наблюдалась активация клеточного звена иммунитета. Аналогичные данные были получены на фоне использования этих препаратов при ревакцинации против гепатита В, кори, краснухи, паротита часто болеющих детей [Маркова, Харьянова, 2001].

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 сибиреязвенной инфекции ликопида и сальмозана [Пименов и др., 2000; Коготкова и др., 2004] и иммунофарма [Волков и др. 2015].

Выявлено повышение эффективности антибактериальной терапии при острой инфекции, вызванной *Burkholderia pseudomallei*, с помощью ликопида [Пяткова, 2008] и интерферона (ИФ- γ) [Lauw et al., 2000; Propst et al., 2010]. Продемонстрировано увеличение иммуногенности и протективности антигенов возбудителя мелиоидоза рекомбинантными цитокинами [Демьянова, 2009] и иммуномодуляторами бестимом [Демьянова и др., 2012] и имунофаном [Хабарова и др., 2018].

Использование полиоксидония при моделировании противотуляремийного вакцинного процесса стимулировало функциональную активность иммунокомпетентных клеток и антителопродукцию у экспериментальных животных [Кравцов и др., 2016]. Зарубежные исследователи эффективно применяли ИЛ-12 для совершенствования специфической профилактики туляремии [Duckett et al., 2005].

Показана возможность снижения иммунизирующей дозы чумной вакцины и, следовательно, её побочного влияния на организм за счёт сочетанного применения с полиоксидонием [Ляпина и др., 2012; Пономарева и др., 2014]. Применение в схеме специфической профилактики чумы беталейкина (рекомбинантный ИЛ-1 β) и полиоксидония [Каральник и др., 2014; Пономарева и др., 2014; Ключева, Щуковская, 2015; Кравцов и др., 2016;

Бугоркова и др., 2017; Ключева 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 инаktivированных бульонных культур *Vibrio cholerae* O1 классического биовара штаммов 569В или КМ-76 серовара Инаба и М-41 серовара Огава [Онищенко и др., 2011]. Антитоксические и вибриоцидные антитела выявляются у вакцинированных до полугода. Вакцинация против холеры включена в календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям. Однако известно, что вакцины, созданные на основе инаktivированных 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 используемых 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 противохолерного 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 противохолерного 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 в селезенке и в пейеровых бляшках.

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

Получены новые данные о действии иммуномодуляторов на гуморальное звено поствакцинального противохолерного иммунитета, свидетельствующие о том, что применение при вакцинации полиоксидония, дерината, ликолида 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 ликолипид в разной степени повышают протективность антигенов, входящих в состав холерной вакцины. Наиболее эффективно увеличивает защитные свойства профилактического препарата ликолипид, 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 липопидом, 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, липопид, 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, ликопид, деринат увеличивают протективность вакцины холерной бивалентной химической, но в разной степени. Ликопид 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.

Апробация материалов диссертации

Основные положения диссертации доложены на научных конференциях:

1. Межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные проблемы диагностики инфекционных заболеваний» (Ростов-на-Дону, 2015);
2. 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);
3. Региональной научно-практической конференции, посвященной 95-летию со дня образования государственной санитарно-эпидемической службы РФ «Актуальные вопросы эпидемиологии, микробиологии и диагностики инфекционных и паразитарных заболеваний в Ростовской области» (Ростов-на-Дону, 2017);
4. XI Съезд Общероссийской общественной организации «Всероссийское научно-практическое общество эпидемиологов, микробиологов и паразитологов» (ВНПОЭМП) «Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения» (Москва, 2017);
5. IX Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням с международным участием (Москва, 2017);
6. IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Социально-значимые и особо опасные

инфекционные заболевания» (Сочи, 2017);

7. 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);

8. X Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням с международным участием (Москва, 2018);

9. Проблемной комиссии «Холера и патогенные для человека вибрионы» (Ростов-на-Дону, 2016, 2017, 2018, 2019 гг.).

10. Межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными заболеваниями на юге России. Ермольевские чтения» (Ростов-на-Дону, 2021).

Публикации

По материалам диссертации опубликована 21 печатная работа, в том числе 12 статей (7 в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ 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.

Самостоятельность выполненной работы

Вклад автора состоит в анализе литературных данных и информационного материала при планировании, определении цели работы, поиске наиболее эффективных путей реализации поставленных задач. Автор принимал участие в разработке дизайна всех экспериментов. Результаты, представленные в данной работе, получены лично автором, либо при непосредственном его участии при выполнении государственной темы № 184-4-16 «Повышение иммуногенных и протективных свойств таблетированной холерной бивалентной химической вакцины с помощью

разных по происхождению иммуномодуляторов у экспериментальных животных». Автор лично участвовал в определении экспрессии маркеров ранней и поздней активации клеток, популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов, продукции цитокинов, количества антигенспецифических антителообразующих клеток, антителопродукции в сыворотке крови и тонком кишечнике экспериментальных животных, а также экспериментах по изучению влияния иммуномодуляторов на протективность холерной вакцины. Автором была осуществлена статистическая обработка результатов и интерпретация полученных данных, которые затем легли в основу основных публикаций по теме диссертационной работы.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 138 страницах машинописного текста. Состоит из введения, глав: обзора литературы, материалы и методы исследования, результатов собственных исследований, обсуждение результатов собственных исследований, а также заключения, выводов и списка литературы. Диссертация иллюстрирована 12 рисунками и 11 таблицами. Список литературы содержит 234 источника, в том числе 124 отечественных и 110 иностранных.

Благодарности

Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю ведущему научному сотруднику к.б.н., и.о. заведующей лабораторией иммунологии отдела природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ Ростовского-на-Дону научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора И.А. Ивановой за неоценимую помощь и всестороннюю поддержку на всех этапах работы, от идеи до конечного результата. Выражает благодарность сотрудникам лаборатории иммунологии отдела природно-очаговых и зоонозных инфекций Ростовского-на-Дону научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора к.б.н. И.А. Беспаловой, к.м.н. Н.Д. Омельченко, А.А. Труфановой, а также сотрудникам лаборатории экспериментально-биологических моделей и биобезопасности

Ростовского-на-Дону научно-исследовательского противочумного института
Роспотребнадзора за помощь в осуществлении практической части
исследования.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ДАННЫХ ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Использование адъювантов при вакцинации против инфекционных болезней

Массовая вакцинопрофилактика некоторых опасных инфекционных болезней по ряду причин не проводится: вакцинируются, как правило, группы людей, которые подвержены риску заражения в силу своей специальности или проживания в тех регионах, где могут встречаться социально-значимые инфекции. Используемые в настоящее время вакцины направлены на активацию иммунных функций, однако в некоторых случаях способны вызывать и их супрессию, а вакцинация лиц с нарушениями иммунного статуса может усугубить эти нарушения и быть неэффективной [Симбирцев и др., 2011]. Кроме того, существующий порядок вакцинации с усредненными дозами вакцин и жесткими схемами их введения уравнивают условия иммунизации граждан и рассчитаны на среднего по иммунологической активности человека. Особенности иммунного статуса отдельных лиц и наличие у людей многочисленных вариантов иммунного ответа на одну и ту же вакцину при этом не учитываются. Особую группу составляют лица с очень высокой иммунологической реакцией на конкретную вакцину, они не нуждаются в повторном введении того же антигена, так как гипериммунизация имеет свои отрицательные стороны [Медуницын, 2017]. Опыт мировой практики по иммунопрофилактике показывает, что среди вакцинированных всегда имеются не отвечающие на вакцину или слабо реагирующие на нее. У этих людей может формироваться бактерионосительство (вирусоносительство), поддерживая тем самым инфекционную заболеваемость. Есть данные, что с клинической точки зрения вакцинация лиц с различными нарушениями в состоянии здоровья безопасна, однако напряженность иммунного ответа у них ниже, чем у практически здоровых лиц. Эта категория в первую очередь нуждается в особом подходе к вакцинации против инфекционных болезней [Афиногенова и др., 2010; Никитюк и др., 2016].

Кроме того, необходимо учитывать, что эффективность вакцинации зависит не только от качества и особенностей используемых вакцин, но и от особенностей генотипа индивидуума, поэтому создание профилактических препаратов со стимулирующими компонентами позволит повысить их иммуногенность целенаправленным действием на иммунную систему организма [Петров, Хаитов, 2011; Li et al., 2022].

В связи с вышесказанным становится очевидным, что на современном этапе наиболее перспективной является стратегия борьбы с инфекционными болезнями любой этиологии, включающая разработку схем комплексного применения вакцин и различных групп иммунобиологических препаратов - иммуномодуляторов, цитокинов и других иммунореагентов, способных стимулировать формирование поствакцинального иммунитета [Алпатова и др., 2020; Юрьева и др., 2021; Facciola et al., 2022]. Представления о понимании механизмов взаимодействия адъювантов с клетками иммунной системы организма остаются не полными. Необходимо продолжать исследования в этой области, поскольку это имеет решающее значение для использования существующих и новых препаратов в стимуляции развития оптимального иммунного ответа против различных возбудителей инфекции [Pulendran et al., 2021; Singleton et al., 2023].

Лекарственные средства, которые относятся к современным иммуномодуляторам, обладают способностью в терапевтических дозах восстанавливать эффективную иммунную защиту. Они могут применяться как у взрослых, так и у детей, при разных сопутствующих заболеваниях на любой стадии при любой степени тяжести, не взаимодействуют с другими лекарственными средствами (антибактериальными, противовирусными, противогрибковыми, сердечно-сосудистыми и др.), могут использоваться у больных с аллергическими заболеваниями [Лусс, 2010; Чеботарева и др., 2011; Караулов, 2012]. Иммуномодуляторы объединяет основное свойство - все они имеют иммунологические точки приложения, т.е. определенные мишени среди клеток иммунной системы. С одной стороны, они выполняют

функцию иммуноадьювантов - повышают иммуногенность вакцин, индуцируя быстрый антиген-специфический ответ, направляя его развитие по гуморальному или клеточному типу в зависимости от свойств патогена, с другой – предотвращают развитие вторичных иммунодефицитных состояний у организма [Медуницын и др., 2010].

При выборе адьювантов следует обращать внимание на увеличение иммуногенности антигенов, входящих в состав вакцин, изменение характера иммунного ответа, снижение количества вводимых антигенов, уменьшение кратности введения вакцин, повышение интенсивности иммунного ответа у лиц со сниженной иммунной активностью, а также на способность адьювантов усиливать иммунологическую память [Di Pasquale et al., 2015; Moyer et al., 2016.].

Экспериментальные исследования настоящего времени направлены на разработку комбинированных вакцин, создающих защиту сразу против нескольких возбудителей инфекционных болезней, в том числе особо опасных инфекций, а также поиску иммуноадьювантов, способных стимулировать иммунный ответ на такие вакцины даже у лиц с ослабленной иммунной активностью и с проявлениями иммунодефицита [Bastola et al., 2017; O'Neill et al., 2021]. Коррекция иммунного ответа на вакцины посредством иммуномодуляторов - это относительно новый и активно развивающийся раздел иммунологии.

В практике уже успешно используются вакцины, в состав которых включены иммуномодуляторы [Баринский и др., 2014; Никифорова и др., 2014; Романенко и др., 2016; Караулов и др., 2019] и разработки в этой области продолжаются.

Экспериментальная комбинированная вакцина против вирусного гепатита А и В «Гепол А+В» прошла клинические испытания, введение в ее состав полиоксидония позволило снизить антигенную нагрузку и повысить иммуногенность входящих в состав дивакцины антигенов [Горбунов и др., 2010]

При использовании вакцины «Энджерикс В» против гепатита В хорошо зарекомендовал себя рекомбинантный ИЛ-1 β , а также цитокиновые препараты бестим и беталейкин, применение которых позволило повысить эффективность вакцинации у больных с вторичными иммунодефицитами и хроническим инфекционным синдромом [Шахгильдян и др., 2010; Симбирцев и др., 2011]. Применение в композиции экспериментальной вакцины против гепатита Е иммуномодулятора глютоксима обеспечивало ее наибольшую иммуногенность [Гуляев и др., 2017]. Иммуномодулятор иммуномакс в значительной степени повышал иммуногенность пептидных антигенов, что свидетельствует о возможности его использования в качестве адъюванта при создании синтетической пептидной вакцины против гепатита С [Егорова и др., 2015]. В экспериментальной вакцине против гепатита В введение ИЛ-2 индуцировало самый высокий ответ Т-лимфоцитов [Kupriyanov et al., 2020]. Синтетические молекулы, принадлежащие к классу имидазохинолинов, являются агонистами TLR7/8 рецепторов и способны индуцировать иммунный ответ Т-хелперов (Th) [Kiefer et al., 2020]. К таким препаратам относится имиквимод, который при сочетанном применении с квадριвалентной рекомбинантной вакциной против вируса папилломы человека в 94,4% случаев приводил к длительной клинической ремиссии этой хронической инфекции [Протасов и др., 2016]. Показано, что одновременное введение полиоксидония и инаktivированного формалином хламидийного антигена вызывало выработку специфических антител и стимуляцию Т-клеточного звена иммунитета [Рубаник, 2006]. Другие исследования показали, что этот иммуномодулятор значительно увеличивал эффективность вакцины против цитомегаловирусов человека и уменьшал количество инъекций вакцинного штамма [Баринский и др., 2015].

Мурабутид является синтетическим иммуномодулятором, распознаваемым рецептором NOD2, содержащимся на клетках млекопитающих, действует как адъювант слизистой оболочки, который повышает иммуногенность вирусоподобных частиц, вводимых

интраназально [Jackson et al., 2012]. Иммуномодулятор маннатид использовался в качестве адъюванта для интраназальной вакцинации против гриппа у мышей. В ходе исследования выявили, что он обладает безопасной и эффективной адъювантной способностью и успешно индуцирует как реакции антител сыворотки и слизистой оболочки, так и клеточно-опосредованный ответ [Ren et al., 2017].

Рекомбинантные цитокины человека ИЛ-1 β и ФНО- α в виде монопрепаратов, а также в виде комплекса цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-2, ФНО- α) повышали протективное действие культуральной антирабической вакцины [Алпатов Н.А. и др., 2018]. Применение иммуномодулятора имиквимод, сконъюгированного с антигенами вируса бешенства, в три раза увеличивало выживаемость лабораторных животных по сравнению с только антигеном бешенства [Liu et al., 2016].

Учеными из НИИВС им. Мечникова РАМН (Москва) совместно с врачами инфекционистами (Ярославль) было показано, что препарат аффинолейкин, введенный с вакциной АКДС, восстанавливал нарушенную иммунокомпетентность и иммунологическую память у детей из группы R75 (ВИЧ-негативные дети от ВИЧ-инфицированных матерей, слабо реагирующие на дифтерийный анатоксин и коклюшный компонент вакцины) [Мац и др., 2010]. Включение препарата виферон (на основе человеческого генно-инженерного ИФ- $\alpha_2\beta$) в комплекс противогриппозной вакцинации способствовало раннему формированию специфического иммунитета и снижало частоту и тяжесть заболевания в эпидемический сезон [Чеботарева и др., 2011]. При оценке влияния тимогена на эффективность и безопасность вакцинации детей против кори и паротита был сделан вывод о том, что назначение этого иммуномодулятора способствует более интенсивному синтезу специфических антител в ранние сроки [Харит и др., 2005]. При ревакцинации против кори, гепатита В, краснухи, паротита у детей, относящихся к группе длительно и часто болеющих, имеются данные о положительном влиянии иммуномодуляторов имунофана, миелопида и

полиоксидония [Маркова и др., 2001]. Аналогичные результаты были получены при вакцинации данной группы детей против бактериальных инфекций, в частности против дифтерии при использовании имунофана [Маркова и др., 2003], миелопида и полиоксидония [Маркова и др., 2001]. И в том, и в другом случае отмечено увеличение антителообразования, а при сочетанном применении миелопида и полиоксидония наблюдалась активация клеточного звена иммунитета. Для возможности создания новой живой противокоревой вакцины с иммуномодулирующими препаратами в ее составе были использованы следующие иммуномодуляторы — реаферон, полиоксидоний, а также цитокины ФНО- α , ИЛ-2 и др. В ходе исследований было показано, что исследуемые препараты оказывают иммуномодулирующее действие и могут быть эффективны при конструировании новых противокоревых вакцин, особенно у детей со сниженным иммунным статусом [Нечаева и др., 2017].

Ежегодные вакцинации против бруцеллеза у лиц, находящихся в зоне риска, сопровождаются патологической сенсibilизацией организма, нарушением в системе фагоцитоза и клеточного иммунитета. Для решения этих проблем исследователи предлагают использовать при вакцинации живой бруцеллезной вакциной иммуномодулятор ликолипид [Богачева и др., 2016].

В отношении арбовирусных инфекций (восточный энцефаломиелит лошадей и клещевой энцефалит) доказана эффективность сочетанного действия специфических вакцин и иммуномодуляторов - ридостина (индуктор интерферонов рибонуклеат натрия), полирибоната, глюкозамурамилдипептида и пептидогликана-160 [Баринский и др., 2012, 2013]. На модели экспериментальных животных активность вакцины против восточного энцефаломиелита лошадей и клещевого энцефалита стимулировали монопрепараты рекомбинантных ИЛ-1 β и ФНО- α , комплекс рекомбинантных цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-2, ФНО- α), гибридный белок неотим (T α -ФНО-T α), а также иммуномодулятор имунофан, который усиливал

иммуногенность вакцины в 1,3-1,5 раза. Исследуемые цитокины также повышали протективный эффект вакцины [Авдеева и др., 2009]. Доказано адъювантное действие препаратов на основе рекомбинантных белков цитокинов - беталейкина (ИЛ-1 β), ронколейкина (ИЛ-2), альнорина (ФНО- α), аффинолейкина, а также имунофана на вакцины против гепатитов А и В, бешенства, клещевого энцефалита у животных. Интересно, что наиболее демонстративно действие этих иммуноадъювантов проявлялось на экспериментальной модели животных с иммуносупрессией (ответ на специфические антигены увеличивался в 1,5 – 7,3 раза), а также при использовании малых доз вакцин, на которые развивался слабый иммунный ответ [Алпатова и др., 2010; 2018].

В настоящее время набирают популярность ДНК и пептидные вакцины, но их существенным недостатком является слабая иммуногенность, поэтому исследования зарубежных ученых направлены на поиск обладающих адъювантной способностью веществ, как природного, так и синтетического происхождения. Для создания эффективной вакцины из пептидной конструкции, следует использовать адъюванты, в качестве которых могут служить природные РАМР, их синтетические аналоги и ряд цитокинов [Firdaus et al., 2022].

Значительное повышение антиген-специфического иммунитета у животных наблюдалось при изучении хемокинов в качестве адъювантов при таких инфекциях как грипп, простой герпес, ВИЧ инфекция. Данные исследования продемонстрировали эффективность применения хемокинов как адъювантов, исходя из их малой токсичности, возможности использования различных форм, универсальности путей доставки [Mohan et al., 2018]. Показано также, что ИФ- α действует как эффективный адъювант для индуцирования противовирусного иммунитета, а его влияние на дифференцировку и активацию дендритных клеток играет важную роль в индукции защитных реакций при разработке различных противовирусных вакцин [Aricò et al., 2012]. При конструировании новых ДНК-вакцин против

различных вирусов гриппа, а также вируса SARS-CoV, как иммуноадьювант был использован ИЛ-2, который усиливал специфические иммунные реакции и индуцировал пролиферацию Т-клеток и натуральных киллеров [Hu et al., 2009]. ИЛ-12 эффективно применялся в составе вакцины против гепатита В [Yang et al., 2006], а также в ДНК-вакцине против гепатита С, повышая их иммуногенность за счет стимуляции продукции цитокинов ИЛ-4 и ИФ- γ , усиливающих противовирусную защиту [Naderi et al., 2013]. ИЛ-15, который индуцирует пролиферацию натуральных киллеров и Т-лимфоцитов, в сочетании с ИЛ-21 значительно повышали иммуногенный эффект ДНК-вакцины против инфекции, вызванной *Toxoplasma gondii* [Li et al., 2014]. Последовательное введение ИЛ-6, ИЛ-7 и ИЛ-15 увеличивало количество CD4⁺ Т-клеток памяти к ДНК-вакцине против ящура [Su et al., 2012].

Активно изучаются адьюванты микробного происхождения и их синтетические аналоги. Они взаимодействуют с Toll подобными рецепторами (TLR) клеток врожденного иммунитета и запускают процесс формирования адаптивного иммунного ответа [Laupèze et al., 2019]. Хорошо известным лигандом, активирующим TLR4, является липополисахарид (ЛПС), поли-(I:C) (полиинозиновая:полицитидиловая кислота) активирует TLR3, флагеллин — TLR5, имидазохинолины — TLR7/8, а CpG-олигодезоксинуклеотиды — TLR9 [Iho et al., 2015; Apostólico et al., 2016]. Высокая эффективность этих веществ показана при применении их в качестве адьювантов при вакцинации против ВИЧ, гриппа, вирусов простого герпеса и папилломы человека, вируса восточного энцефалита лошадей [Ma et al., 2014; Sajadian et al., 2014].

В качестве адьюванта для усиления напряженности специфического иммунитета на инактивированную вакцину против вируса гриппа А был исследован агонист TLR7/8 на основе 2,4-диаминохиназолина (соединение 31). Интраназальное введение мышам соединения 31 вместе с инактивированной вакциной индуцировало синтез провоспалительных

цитокинов и усиливало выработку специфических IgG и IgA [Noh et al., 2022].

При разработке интраназальных вакцин наиболее мощными адъювантами являются аденозиндифосфат (АДФ)-рибозилирующие бактериальные энтеротоксины, холерный токсин и токсины с термической лабильностью *Escherichia coli*. Они обладают высокой иммуногенностью, но крайне токсичны для организма, поэтому ведутся работы по снижению токсичности этих молекул с сохранением их адъювантной активности [Laik et al., 2018].

Особого внимания заслуживают адъюванты из природных полисахаридов, такие как хитозан, глюкан, манноза, полисахарид инулина и полисахарид китайской лекарственной травы. Они обладают свойствами внутренней иммуномодуляции, биосовместимости, биоразлагаемости, низкой токсичности и безопасности. Кроме того, было доказано, что различные природные полисахариды обладают лучшими иммуностимулирующими эффектами, усиливающими гуморальный и клеточный иммунитет, что позволяет использовать их для усиления иммуногенности многих вакцин [Sun et al., 2018; Mehrabi et al., 2018; Gao et al., 2023]. Дельта-инулин, кристаллизованная форма полисахарида инулина, выпускаемая как адъювант под торговым названием Advax™, усиливал иммуногенность вакцин, что было показано на различных биомоделях, инфицированных вирусами гриппа, японского энцефалита, лихорадки Западного Нила, гепатита В и вирусом иммунодефицита человека [Курашова и др., 2018]. Пептидогликан кислый, выделенный из ростков картофеля и зарегистрированный как лечебный препарат иммуномакс, в значительной степени увеличивал иммуногенность антигенов, входящих в состав синтетической пептидной вакцины против гепатита С [Егорова и др., 2015].

α -Галактозилцерамид (α -GalCer) представляет собой синтетический гликолипидный антиген, который специфически связывается с CD1d, неклассической молекулой МНС I. Лиганды α -GalCer проявляют

адъювантную активность для белковых и ДНК-вакцин, стимулируя естественные киллерные клетки мыши. Положительный опыт сочетанного применения α -GalCer с ДНК-вакциной против гриппа открывает новые подходы к разработке эффективных профилактических средств против этой инфекции [Photoukhi et al., 2017]. Внутривентрикулярная иммунизация мышей цельноклеточным убитым антигеном *Helicobacter pylori*, введенным вместе с α -GalCer, индуцировала эффективную иммунную защиту против этого возбудителя, что свидетельствовало о перспективности использования α -GalCer в качестве адъюванта в составе пероральной вакцины против данной инфекции [Longet et al., 2019].

Adjuplex[®] представляет собой нетоксичный адъювант на основе карбомера (синтетические высокомолекулярные полиакриловые кислоты), который способствует повышению эффективности вакцин за счет увеличения доставки различных антигенов и активации CD8⁺ лимфоцитов и Th1 типа. На экспериментальных моделях показано, что Adjuplex[®] в составе разрабатываемой гриппозной вакцины обладал иммуноактивирующими свойствами и усиливал защитный адаптивный иммунитет против заражения гриппом [Lee, Suresh, 2022].

Для усиления иммуностимулирующего действия на макроорганизм используют комбинации из двух или нескольких адъювантов, входящих в состав вакцинного препарата. Применение холерного токсина и липидных наночастиц значительно улучшало иммуногенность и протективность экспериментальной интраназальной универсальной вакцины против гриппа [Bernasconi et al., 2021].

Наноэмульсия, состоящая из холина, ниацина, сквалена и Твина 80, способствовала поддержанию структурной целостности и стабильности антигена вируса ящура. Использование этого адъюванта при иммунизации инактивированным вирусом ящура увеличивало индукцию специфических IgG, а также вызывало активацию В-лимфоцитов и секрецию ИЛ-4 у мышей [Lin et al., 2022].

Применение транс ретиноевой кислоты в форме витамина А за час до приема пероральной вакцины против брюшного тифа способствовало увеличению секреции секреторного иммуноглобулина А (sIgA) в кишечнике. Данный подход может быть простым, дешевым и безопасным способом возможного предотвращения смертности, вызванной диарейными заболеваниями для стран с низким уровнем дохода [Hao et al., 2021].

В последние годы проводятся эксперименты по изучению возможности применения физических факторов (лазер, радиочастота) для усиления иммунного ответа при внутрикожной вакцинации. Использование физической энергии для индуцирования тканевого стресса и высвобождения эндогенных сигналов опасности способствует более быстрому развитию поствакцинального иммунитета. Безопасность и эффективность физических адъювантов были недавно подтверждены рядом доклинических исследований на моделях животных. Однако, несмотря на успешные результаты, использование данных факторов при вакцинации требует дальнейших доклинических и клинических исследований [Chen, 2023].

Таким образом, все вышеперечисленное говорит об эффективности различных адъювантов при вакцинации и целесообразности их использования со средствами специфической профилактики инфекционных болезней самой разной этиологии.

1.2 Совершенствование специфической профилактики особо опасных инфекций с помощью иммуноадъювантов

Анализ данных литературы свидетельствует о достоверном повышении эффективности специфической профилактики особо опасных инфекций в сочетании с иммуноадъювантами. Так, после введения в схему вакцинации сальмозана зарегистрировано повышение иммуногенности живых сибиреязвенных вакцин [Пименов и др., 2000]. О.И. Коготкова с соавт. показали, что применение ликопада при вакцинации живой вакциной СТИ против сибирской язвы в большей степени стимулировало клеточное

звено иммунитета и повышало выживаемость мышей после заражения, по сравнению с иммунизированными животными [Коготкова и др., 2004]. Использование при вакцинации против сибирской язвы иммуномодулятора иммунофарм способствовало снижению реактогенности живой противосибиреязвенной вакцины из штамма 55 ВНИИВВиМ и стимулировало на 30-40% повышение иммунитета у морских свинок по сравнению с контрольными животными, привитыми только вакциной [Волков и др., 2015]. Включение комбинированного адъюванта, состоящего из субъединицы А холерного токсина и ИЛ-15, в экспериментальную двухвалентную вакцину против сибирской язвы и натуральной оспы приводило к значимому увеличению титра антител и выживаемости экспериментальных животных после заражения спорами сибирской язвы по сравнению с контрольной группой, иммунизированной только вакциной [Park et al., 2021].

Демьянова О.Б. с соавт. доказали, что рекомбинантные цитокины, воздействуя преимущественно на механизмы клеточного иммунитета, могут быть использованы для повышения иммуногенности и протективности антигенов возбудителя мелиоидоза [Демьянова и др., 2014]. При этом для стимуляции первой фазы иммунного ответа целесообразно применение ИФ- γ , инициирующего неспецифические клеточные факторы защиты, а для усиления вторичного иммунного ответа предпочтительно использовать ИЛ-2, усиливающий механизмы специфического клеточного иммунитета [Жукова и др., 2013; Демьянова и др., 2014]. Кроме того, иммуногенные свойства противомелиоидозных препаратов повышали и другие иммуномодуляторы - бестим и имунофан, которые увеличивали выживаемость экспериментальных животных после их заражения высоковирулентными штаммами возбудителя [Хабарова и др., 2018]. Исследователями сделан вывод о целесообразности включения бестима в комплексную схему иммунизации против этой инфекции. Сочетанное использование рекомбинантных цитокинов и мелиоидозных антигенов стимулировало макрофагально-фагоцитарную

систему и показатели клеточного и гуморального иммунитета [Жукова и др., 2011]. По мнению многих авторов применение иммуномодуляторов различной природы для активации клеточных иммунных реакций при специфической профилактике сапа и мелиоидоза является наиболее перспективным, безопасным и доступным методом [Жукова и др., 2009; Топорков и др., 2017].

Саратовские исследователи, изучая влияние иммуномодуляторов на реактивность клеток иммунной системы при моделировании противотуляремийного вакцинного процесса, установили положительное влияние полиоксидония на персистенцию вакцинного штамма в клетках макрофагально-фагоцитарной системы мышей. На фоне более длительной функциональной активации спленоцитов и пониженной интенсивности повреждения макрофагов в селезёнке и брюшной полости существенно повышались титры специфических противотуляремийных антител [Кравцов и др., 2016]. Для снижения реактогенных свойств живой туляремийной вакцины может быть перспективным использование полиоксидония и даларгина, подавляющих апоптоз макрофагов и лизис погибших при взаимодействии с туляремийными антигенами лейкоцитов [Кравцов и др., 2017]. Зарубежные учёные эффективно использовали ИЛ-12 для совершенствования как специфической, так и экстренной профилактики туляремии [Duckett et al., 2005; Baron et al., 2007]. Было обнаружено, что интраназальное введение экзогенного ИЛ-12 во время вакцинации обеспечивало выживание 90-100% мышей после заражения летальной дозой возбудителя туляремии.

Применение ИЛ -12 в качестве адъюванта оказалось перспективным и при легочной чуме у иммунизированных мышей [Kumar et al., 2011]. ИЛ-12 может использоваться также для повышения защитного иммунитета против легочной чумы, но его эффективность зависит от дозы [Yamanaka et al., 2008].

Иммунизация экспериментальной вакциной, состоящей из рекомбинантного белка чумного микроба, альгидрогеля и цитокинов ИЛ-2 и GM-CSF, приводила к увеличению ответа Т-фолликулярных хелперных клеток и В-клеток зародышевого центра после первичной иммунизации по сравнению с препаратом, содержащим только антиген чумного микроба и альгидрогелевый адъювант [Galloway et al., 2022].

При изучении способности полиоксидония стимулировать выработку специфического иммунитета к возбудителю чумы выявлено значительное усиление гуморального и клеточного ответа, что позволило снизить антигенную нагрузку на макроорганизм. Полученные данные показали перспективность использования иммуномодулятора при создании высокоэффективных субъединичных противочумных вакцин [Ляпина и др., 2012; Пономарева и др., 2014]. В опытах на взрослых кроликах и морских свинках доказана адъювантная способность препаратов беталейкин и полиоксидония в отношении иммуногенной и протективной активностей живой противочумной вакцины [Каральник и др., 2014; Пономарева и др., 2014]. Полученные С.Н. Ключевой и Т.Н. Щуковской данные свидетельствуют об эффективности полиоксидония во время вакцинации (ревакцинации) против чумы [Ключева, Щуковская, 2015]. Полиоксидоний оказывал стимулирующее воздействие на реактивность клеток фагоцитарной системы привитых от чумы лабораторных животных, повышал протективную активность живой противочумной вакцины почти в три раза, что позволило существенно снизить дозу вакцины, не теряя при этом эффективности защиты организма от чумной инфекции. Полученные результаты доказывают перспективность использования этого препарата для повышения эффективности противочумной вакцинации [Кравцов и др., 2016; Бугоркова и др., 2017; Ключева и др., 2019; Щуковская и др., 2021]. Полиоксидоний и даларгин усиливали протективные свойства вакцинного штамма чумного микроба *Yersinia pestis EV*, что свидетельствует о целесообразности применения иммуноадъювантов в схеме специфической и экстренной

профилактики чумы [Щуковская и др., 2020]. Сочетанное введение экспериментальным животным вакцинного штамма *Y. pestis EV* НИИЭГ с полиоксидонием или ингароном продемонстрировало, что и тот и другой усиливали у животных реакцию со стороны иммунокомпетентных клеток, способствовали активации гуморального ответа и продукции медиаторов клеточного звена, не оказывали повреждающего действия на ткани макроорганизма. Эффективность сочетанного применения *Y. pestis EV* НИИЭГ с иммуномодуляторами в тесте заражения мышей подтверждена только для полиоксидония [Гончарова и др., 2020]. Другими авторами путем оценки внутриклеточной экспрессии цитокинов Т-хелперами селезенки была также показана эффективность применения этого иммунопрепарата при иммунизации экспериментальных животных вакцинным штаммом *Y. pestis EV* НИИЭГ [Клюева и др., 2021]. Под влиянием полиоксидония отмечено снижение адгезивной активности клеток *Y. pestis EV* НИИЭГ к коллагену человека IV типа, а также повышение иммуногенности антигенов вакцинного штамма в тестах *in vitro* [Щуковская и др., 2021]. Показано, что экспериментальный селенсодержащий препарат - нонан дибромид (974zh) - обладал иммуномодулирующим и адъювантным действием, повышая эффективность вакцины *Y. pestis EV* НИИЭГ и снижая ее побочные эффекты. Препарат усиливал иммуногенность вакцинного штамма, увеличивал Т- и В-зависимые зоны селезёнки и лимфатических узлов, пролиферацию плазматических клеток, а также сокращал патологические изменения в печени и надпочечниках [Дубровина и др., 2022].

Экспериментально доказано, что флагеллин, агонист TLR5, в качестве адъюванта усиливал иммунный ответ Th1-типа на антигены чумного микроба и обеспечивал защиту от респираторной инфекции *Y. pestis* 100% мышей [Mizel et al., 2009]. Олигодезоксинуклеотид CpG, агонист TLR-9, конъюгированный с поверхностным гликопротеином чумного микроба, вызывал усиленный Th1/Th2 иммунный ответ и защищал экспериментальных животных от бубонной и легочной чумы [Amemia et al., 2009; Khimki et al.,

2013]. Комплексный препарат на основе F1-антигена и клеточных оболочек в сочетании с адъювантами - тДНК чумного микроба, синтетическим мурамилдипептидом, обладающими способностью стимулировать рецепторы врожденного иммунитета и повышать резистентность макроорганизма - может использоваться для создания эффективной вакцины, способной активировать врожденный иммунитет и стимулировать формирование адаптивного иммунного ответа организма [Войткова и др., 2014].

Благодаря появлению нового класса веществ – тиопоэтинов, являющихся метаболическими иммунокорректорами, стало возможным создание новых комплексных средств для профилактики и лечения тяжёлых инфекционных заболеваний, а также совершенствование уже имеющихся схем. Получены свидетельства их системного цитопротекторного действия и способности повышать специфический иммунный ответ при вакцинации живой чумной вакциной, туляреминым С-комплексом, вакцинными штаммами возбудителей мелиоидоза и туляремии [Жемчугов и др., 2004].

Таким образом, анализ данных литературы свидетельствует о целесообразности и перспективности дальнейших исследований по разработке схем сочетанного применения иммуномодуляторов для повышения эффективности вакцинации против возбудителей особо опасных инфекций.

1.3 Специфическая профилактика холеры и способы ее совершенствования

Холера остается одной из актуальных проблем здравоохранения в мире. Несмотря на современные методы лечения, улучшение качества питьевой воды и соблюдение санитарных мер, ежегодно от холеры умирают около 100000 человек. Специфическая профилактика холеры на сегодняшний день является наиболее эффективным способом предупреждения и ликвидации эпидемий. Показано, что даже вакцины с недостаточной иммуногенностью, в случае широкого их применения, способны

обеспечивать достоверную защиту за счет развития популяционного иммунитета [Desai, Clemens, 2012; Lopez et al., 2014]. Многочисленные исследования, направленные на понимание механизмов формирования иммунитета при холере, показали, что иммунитет человека обусловлен антибактериальными и антитоксическими интерстициальными антителами sIgA к липополисахариду и холерному токсину, что подтолкнуло исследователей к созданию оральных вакцин. При различных клинических испытаниях оральные вакцины доказали свою высокую эффективность и безопасность по сравнению с парентеральными вакцинами [Leung et al., 2012; Clemens et al., 2017]. Но не все оральные вакцины способны вызвать достаточно напряженный иммунный ответ в основном из-за «агрессивной» среды желудочно-кишечного тракта и слабой активности антигенпрезентирующих клеток, что способствует неадекватному ответу sIgA. Учитывая это обстоятельство, использование подходящих и эффективных адъювантов для вакцинных препаратов может иметь важное значение для успешной пероральной иммунизации [Ou et al., 2023].

На данном этапе ВОЗ рекомендует использование холерных вакцин для предотвращения возникновения эпидемий холеры вне эндемичных территорий и их применение для вакцинации контингентов с повышенным риском заражения, а также путешественников и туристов.

В России зарегистрирована вакцина холерная бивалентная химическая (ФКУН РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора), которая представляет собой смесь холерогена-анатоксина и О-антигенов, полученных из инаktivированных формалином бульонных культур *Vibrio cholerae* O1 классического биовара штаммов 569В или KM76 серовара Инаба и M41 серовара Огава [Онищенко и др., 2011]. Антитела к обоим сероварам холерных вибрионов O1 серогруппы выявляются у привитых в течение шести месяцев поствакцинального периода [Онищенко и др., 2016]. В 2001 году в России вакцинация против холеры была включена в Календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям [Горьев и др.,

2018]. Вакцинации по эпидпоказаниям подлежат лица, выезжающие в неблагополучные по холере страны (регионы), а также население субъектов Российской Федерации в случае осложнения санитарно-эпидемиологической обстановки по холере в сопредельных странах и на территории России.

В мире лицензированы шесть оральных холерных вакцин: Dukoral®, mORC-VAX®, Shanchol®, Euvichol®, Vaxchora®, Oravacs®.

Dukoral® (Швеция) представляет собой четырехвалентную оральную убитую вакцину, состоящую из инаktivированных нагреванием или формалином вибрионов *V. cholerae* O1 и рекомбинантной В-субъединицы холерного токсина. Стандартный курс вакцинации взрослых и детей в возрасте от 6 лет состоит из приема двух доз с интервалом 1–6 недель, детей в возрасте от 2 до 6 лет — 3 доз с интервалом 1–6 недель. Вакцина Dukoral® разрешена к применению в Швеции с 1991 г., а в последующие годы она была зарегистрирована более чем в 60 странах. Развитие иммунитета наблюдается уже через неделю после последнего введения препарата и сохраняется в течение трех лет у 70% вакцинированных старше пятилетнего возраста. Вакцина остается стабильной в течение трех-четырех лет, если хранится при 4°C, и в течение одного месяца – при 37°C [Ali et al., 2005; Sinclair et al., 2011].

Бивалентные инаktivированные цельноклеточные вакцины mORC-VAX®, Shanchol®, Euvichol® создавались на основе технологии производства вакцины Dukoral®, но без использования рекомбинантной В-субъединицы холерного токсина.

Вакцина mORC-Vax® производится во Вьетнаме и применяется только в этой стране. В состав вакцины входят два штамма O1 Огава классических биоваров. Клинические испытания вакцины показали ее иммунологическую эффективность и безопасность для взрослых и детей в возрасте от одного года. Разработан вариант вакцины, включающий убитые клетки *V. cholerae* O139. [Thiem et al., 2006; Lopez et al., 2014].

Технология производства вакцины Dukoral® была передана компании Shantha Biotechnics (Индия), которая в 2009 г. зарегистрировала ее под наименованием Shanchol®, и компании EuBiologics Co., Ltd. (Корея), зарегистрировавшей вакцину под наименованием Euvichol®. Проведенные клинические испытания вакцины Shanchol® подтвердили ее безопасность, хорошую переносимость и эффективность. Следует отметить, что значительная протективная защита наблюдалась у детей в возрасте от года до четырех лет в течение 2 лет наблюдения, а в старших возрастных группах — в течение 3 лет. Показатели оценки иммунного ответа вакцины Euvichol® не отличались от соответствующих показателей вакцины Shanchol® [Sur et al., 2011; Bhattacharya et al., 2013; Baik et al., 2015].

Живая оральная вакцина Vaxchora® производства Pax Vax Bermuda Ltd. (США) была одобрена для применения в США в 2016 г. Вакцина предназначена для вакцинации взрослых туристов в возрасте от 18 до 64 лет, планирующих посещение территории с высоким риском заражения холерой. Одна доза вакцины Vaxchora® содержит от 4×10^8 до 2×10^9 живых клеток *V. cholerae* O1 CVD 103-HgR, который был получен из штамма *V. cholerae* 569В путем делеции гена *ctxA*, ответственного за синтез А-субъединицы холерного токсина, и с сохранением способности к продукции В-субъединицы. Кроме этого, в ген *hlyA* гемолизина был внедрен маркер устойчивости к ртути для дифференциации штамма CVD 103-HgR от «диких» штаммов возбудителя холеры. Было установлено, что эффективность препарата при заражении через 10 суток после иммунизации составила 90 % [Chen et al., 2016; Levin et al., 2017].

Вакцина OraVacs® производства Shanghai United Cell Biotechnology (Китай) лицензирована в Китае, на Филиппинах и по составу идентична вакцине Dukoral®. OraVacs® предназначена для иммунизации взрослых и детей старше 11 лет, курс вакцинации состоит из последовательного приема трех капсул по схеме 1–7–28 сутки. Для оценки безопасности и эффективности вакцины OraVacs® были проведены клинические испытания,

в ходе которых ее эффективность составила 70%. Менее чем в 7% случаев наблюдались боли и дискомфорт в животе, крапивница, тошнота, диарея, головная боль. Так же было отмечено, что вакцина OraVacs®, как и Dukoral®, предохраняет от инфицирования энтеротоксигенной кишечной палочкой [Shaikh H. et al., 2020].

Несмотря на очевидные успехи в вакцинации против холеры, ни одна из существующих вакцин не дает полноценной и длительной защиты и поэтому проблема совершенствования специфической профилактики холеры остается открытой [Azman et al., 2016]. Живые ослабленные вакцины индуцируют достаточно сильный протективный ответ, но не подходят людям с низкой иммунной защитой и аутоиммунными заболеваниями. Убитые вакцины не способны обеспечить долгосрочную защиту и не подходят для детей в возрасте до года [Pastor et al., 2013]. Ученые разных стран продолжают эксперименты по созданию эффективных противохолерных вакцин, используя при этом последние новейшие разработки в области вакцинопрофилактики. Перед разработчиками при создании новых холерных вакцин стоят следующие задачи: возможность использования профилактических препаратов в различных чрезвычайных ситуациях, однократное введение, снижении дозы вакцины для некоторых категорий, возможность введения детям младше двух лет, формирование продолжительного напряженного иммунитета. Эти задачи могут быть решены благодаря созданию конъюгированных и трансгенных вакцин, усовершенствованию существующих живых вакцин, а также применению при вакцинации адъювантов различного происхождения [Горяев и др., 2018].

Разработка холерных вакцин в основном идет по двум направлениям: первое - использование живых ослабленных штаммов, второе - штаммы холерного вибриона подвергаются различным генно-инженерным модификациям для создания химических вакцин.

Эксперименты по использованию сконструированного штамма *Escherichia coli* с экспрессией В субъединицы холерного токсина показали

возможность разработки эффективных и безопасных холерных вакцин [Янов и др., 2010].

Шведскими учеными был выделен новый нетоксигенный вакцинный штамм *V. cholerae* O1 (MS1342), экспрессирующий антигены сероваров Огава и Инаба. Оральная иммунизация мышей бактериальными клетками этого штамма индуцировала выработку у животных специфичных Огава, Инаба и перекрестно-реагирующих сывороточных антител. Этот штамм может быть использован при создании цельноклеточной вакцины, обеспечивающей защиту от *V. cholerae* O1 сероваров Инаба и Огава [Lebens et al., 2011]. На Кубе был генетически модифицирован вирулентный штамм *V. cholerae* O139 CRC266, в результате чего один из полученных штаммов, обозначенный TLP01, стал полностью аттенуированным и обладал иммуногенностью [Ledón et al., 2012].

Получены нетоксигенные штаммы холерного вибриона *V. cholerae* *El Tor Inaba* М 569 и *V. cholerae* *El Tor Ogawa* 5/65, являющиеся продуцентами O1-антигена. Для продукции O139 антигена показана возможность использования нетоксигенного штамма *V. cholerae* O139 М377 [Еремин и др., 2013].

Кубинскими авторами предложен новый кандидат в вакцину против холеры - термически убитые целые клетки штамма *V. cholerae* C7258 [(Lopez et al., 2011; Fernández et al., 2013)].

Потребность в вакцинах, которые могли бы одновременно обеспечивать защиту населения от нескольких инфекций, легла в основу разработки комбинированных вакцин. Американскими исследователями при использовании "теней" (пустых клеток бактерий) *V. cholerae* (*rVCG*) был сконструирован мультисубъединичный штамм, коэкспрессирующий порин В и полиморфный белок D мембраны *Chlamydia trachomatis* [Eko et al., 2011]. Полученные данные свидетельствуют о способности мультисубъединичной вакцины индуцировать перекрестный иммунитет против хламидий и вибриоцидный иммунный ответ, что указывает на возможность разработки

комбинированной вакцины широкого спектра действия. Появились сообщения о новом вакцинном штамме *Salmonella typhimurium* Z234, экспрессирующем В-субъединицу холерного токсина. Наличие эффективного иммунного ответа, индуцируемого этим штаммом, позволяет рассматривать его в качестве многообещающего кандидата в поливалентную вакцину для одновременной защиты людей от *S. typhimurium* и *V. cholerae* [Vishwakarma et al., 2015].

NaitiV – штамм, полученный из клинического изолята *V. cholerae* *El Tor* *O1* *Ogawa* во время вспышки на Гаити в 2010 г, обладал хорошей иммуногенностью и обеспечивал длительную защиту против экспериментальной холеры у животных [Hubbard et al., 2018; Sit et al., 2019].

Быстрая разработка и внедрение генетически модифицированных вакцин является эффективным способом борьбы с пандемиями. На основе дикого штамма *V. cholerae* был создан генетически стабильный и относительно безопасный вакцинный штамм-кандидат *V. cholerae* с *RecA* делецией и экспрессией В субъединицы холерного токсина. Данная стратегия может быть применена не только к *V. cholerae*, но и к другим важным бактериальным патогенам человека [Karpov et al., 2021].

На данном этапе две вакцины, разработанные в Бангладеш, проходят последние клинические испытания на предмет безопасности и иммуногенности у здоровых взрослых и детей. Cholvaх представляет собой двухвалентную цельноклеточную вакцину, производимую Incepta Vaccine Ltd (Дакка, Бангладеш). Состав и процесс производства Cholvaх аналогичен Shanchol™ и Euvichol®. На первых этапах клинических испытаний Cholvaх по безопасности и иммуногенности не уступал Shanchol [Chowdhury et al., 2022].

HillChol™ — это одновалентная инактивированная формальдегидом цельноклеточная вакцина, приготовленная из рекомбинантного штамма *V. cholerae* *Hikojima* MS1568, производимая этой же компанией [Shaikh et al., 2020]. Недавно HillChol™ прошел исследование безопасности и

иммуногенности у взрослых, детей старшего возраста и детей младшего возраста в Бангладеш. Также ведется работа по разработке улучшенной вакцины HillChol-B для использования в первую очередь при вспышках холеры у путешественников. Преимущество данной оральной вакцины в ее доступности и масштабности производства [Karlsson et al., 2014; Chowdhury et al., 2017, 2021; Sharma et al., 2020].

DuoChol™ содержит лиофилизированные убитые формалином изогенные штаммы El Tor Ogawa и Inaba и рекомбинантную субъединицу В холерного токсина в энтерозащищенной капсуле. Эта экспериментальная вакцина находится на стадии доклинической разработки в Швеции [Holmgren, Lebens, 2019].

О возможности использования везикул наружных мембран *V. cholerae* для создания вакцины нового поколения свидетельствуют проведенные эксперименты [Bishop et al., 2012; Leitner et al., 2013]. Показано, что интраназальная иммунизация белых мышей везикулами холерных вибрионов индуцирует у этих животных высокие титры специфических антител и предотвращает развитие холеры у их потомства [Leitner et al., 2015]. Выявлены иммуногенная и протективная активности препаратов наружных мембран, полученных из штамма *V. cholerae* El Tor 18950 (*ctx⁻*, *tcp⁻*, *OmpT⁺*, *OmpU⁻*, *OmpW⁻*), что делает перспективным использование их для специфической профилактики экспериментальной холеры [Омельченко и др., 2015].

Одним из успешных направлений является создание вакцин на основе трансгенных растений. Есть сведения об эффективности использования вакцины против субъединицы В холерного токсина на основе риса. Китайскими учеными заложена основа для исследования возможности использования В субъединицы холерного токсина при разработке съедобной вакцины против холеры на основе томатов [Sharma et al., 2008]. Японскими авторами создана оральная вакцина «MucoRice» на основе риса. Вакцина индуцирует специфичный к холерному токсину ответ сывороточных IgG и

мукозальных sIgA с нейтрализующей активностью. [Tokuhara et al., 2010]. Вакцины на растительной основе имеют некоторые преимущества перед традиционными вакцинами в отношении стоимости, безопасности, стабильности и устойчивости к перевариванию в желудке [Azegami et al., 2015; Kashima et al., 2016].

Активно ведутся работы по поиску новых веществ и препаратов, обладающих адъювантной активностью в отношении средств профилактики холеры. Применение транс-ретиноевой кислоты до вакцинации снижало воспалительный процесс в тонком кишечнике, а также повышало иммунный ответ и защитную эффективность экспериментальной пентавалентной вакцины на основе везикул наружных мембран холерного вибриона [Sinha et al., 2017].

Использование перорально адъюванта α -GalCer в сочетании с вакциной Dukoral[®], а также в сочетании с новым убитым многокомпонентным цельноклеточным штаммом *V. cholerae*, продемонстрировало увеличение иммуногенности вакцины и антигенов возбудителя холеры [Davit et al., 2019].

Для стабилизации рекомбинантной субъединицы В холерного токсина использовали мезопористые наночастицы кремнезема, которые в ходе эксперимента показали большую, по сравнению с просто антигенами холерного токсина, эффективность в индуцировании иммунных реакций, что свидетельствует о возможности использования этих частиц в оральной вакцине против холеры [Karimi Bavandpour et al., 2020]. Прототип вакцины, состоящей из антигенов *V. cholerae*, конъюгированных с наночастицами золота, показал на модели животных более высокую иммуногенность по сравнению с коммерческой вакциной, используемой в качестве контроля [Dikman et al., 2020]. Оценка эффективности наночастиц селена с налоксаном (антагонистом опиоидных рецепторов) в качестве нового адъюванта для усиления иммунных реакций, вызванных введением убитых холерных вибрионов, выявила значительное увеличение синтеза специфичных к *V.*

cholerae иммуноглобулинов классов G и A и более высокую выживаемость мышей, по сравнению с группой животных, вакцинированных Dukoral® [Raahati et al., 2020]. Недавние исследования показали, что добавление фосфата алюминия к экспериментальной конъюгированной вакцине против холеры усиливало иммунные реакции; выработку специфических антител, активацию В-клеток памяти и увеличивало защиту от токсигенных штаммов *V. cholerae* [Chong et al., 2021].

Соли хитозана относятся к природным биополимерам. Они способны положительно влиять на иммунные реакции в организме, что позволяет им стать потенциальными кандидатами в качестве безопасных, дешевых и эффективных адъювантов, а также использовать их как носители для доставки вакцин [Tabrizi et al., 2018]. Добавление хитозана и альгинатной соли к экспериментальной парентеральной убитой вакцине против холеры значительно улучшило иммунный ответ, о чем свидетельствовало увеличение специфических антител, усиление пролиферации иммунокомпетентных клеток и высокая степень защиты от различных доз холерного вибриона [AbdelAllah et al., 2022].

Введение сульфатида с пероральной вакциной против холеры Dukoral® приводило к усилению продукции sIgA в кишечнике и к активации натуральных киллерных клеток, что дает возможность рассматривать сульфатид перспективным адъювантом для включения в пероральную вакцину против холеры [Al buti et al., 2021].

Таким образом, анализ данных литературы свидетельствует об эффективности применения различных адъювантов при вакцинации против холеры.

Немногочисленными примерами использования иммуномодуляторов для совершенствования специфической профилактики холеры в России являются эксперименты по изучению возможности усиления иммуногенных свойств отдельных антигенов холерного вибриона. Так Р.В. Петрову и др. удалось увеличить иммунологическую активность деацилированных

липополисахаридов холерных вибрионов сероваров Инаба или Огава, а также В субъединицы холерного токсина посредством их конъюгации с полимерным иммуноадьювантным носителем – азоксимера бромидом (полиоксидоний) [Петров и др. 1991; Петров и др. 1991]. И.А. Ивановой и др. показана возможность использования имунофана для предотвращения развития транзиторного поствакцинального апоптотического иммунодефицита, вызванного иммунизацией экспериментальных животных холерным токсином и липополисахаридом *V. cholerae*, а также для снижения степени выраженности инфекционного процесса при неспецифической профилактике этого заболевания [Иванова и др., 2012; Иванова и др., 2013].

Эффективность других иммуномодуляторов в отношении противохолерных вакцин в России и за рубежом не изучалась.

Фармпрепараты, использование которых возможно для стимуляции поствакцинального противохолерного иммунитета, должны активировать как местный, так и системный иммунный ответ, поэтому мы остановили свой выбор на следующих иммуномодуляторах:

- Полиоксидоний (ПО) (ООО «НПО Петровакс Фарм», Россия) (азоксимера бромид - сополимер N-окси-1,4-этиленпиперазина и N-карбокси-1,4-этиленпиперазина бромид) - высокомолекулярное (молекулярная масса 100 kD) физиологически активное соединение, обладающее иммуностимулирующими, детоксицирующими, мембраностабилизирующими и антиоксидантными свойствами. Данный препарат является хорошо изученным, доказана его высокая эффективность и безопасность, разработаны схемы и дозы введения при различных заболеваниях. Напрямую взаимодействуя с рецепторами фагоцитирующих клеток, он изменяет их функциональную активность: стимулирует процесс фагоцитоза, синтеза цитокинов, а также усиливает бактерицидные свойства клеток по типу кислороднезависимых механизмов. ПО увеличивает цитотоксичность естественных киллеров (NK-клетки), процессы антителообразования, активирует лимфоидные клетки, находящиеся в

кишечнике, а именно В-клетки, продуцирующие sIgA. Азоксимера бромид влияет на эффекторные функции клеток только в случае их снижения, восстанавливает иммунные реакции при вторичных иммунодефицитных состояниях, увеличивает резистентность организма в отношении локальных и генерализованных инфекций, обладает противовоспалительным действием. Повышает устойчивость мембран клеток и обладает выраженным антиоксидантным действием, снижая токсичность химических, лекарственных веществ и инфекционных агентов при их совместном применении. ПО, воздействуя на все факторы неспецифической и специфической защиты организма от чужеродных агентов, не препятствует естественному развитию иммунного ответа, что делает его универсальным адъювантом и носителем вакцинных антигенов. [Пинегин, 2004; Варфоломеева, Пинегин, 2011; Лусс, 2015; Кривопапов, Щербань, 2017].

- Деринат (ДЕ) (ЗАО «ФП «Техномедсервис», Россия) (дезоксирибонуклеат натрия - натриевая соль двухспиральной высокоочищенной деполимеризованной нативной дезоксирибонуклеиновой кислоты с молекулярной массой 270–500 kD) обладает иммунорегулирующими, иммуностимулирующими, репаративными и цитопротективными свойствами. Проведенные исследования показали эффективность и безопасность применения дерината в комплексной терапии при различных инфекционных и гнойно-септических заболеваниях. На территории Российской Федерации применение препарата разрешено Приказом Министерства Здравоохранения РФ № 316 от 13.08.1996. Иммунорегулирующие свойства дерината проявляются в нормализации исходно пониженных иммунологических показателей. Этот препарат усиливает созревание, дифференцировку, бактерицидную активность лейкоцитов, повышает хемотаксис, фагоцитоз, увеличивает продукцию цитокинов и компонентов лизосом. Иммуномодулирующий эффект дерината проявляется в восстановлении, активизации и перестройке всех ступеней иммунной системы: усилении адгезии клеток, увеличении числа и

активности нейтрофилов, макрофагов, NK-клеток, повышении количества Т-лимфоцитов, а также стимуляции В- лимфоцитов воздействуя тем самым на как на клеточное, так и гуморальное звено иммунитета. Деринат способствует увеличению регенерации и восстановлению тканей и слизистых оболочек, а также проявляет антиоксидантные, мембраностабилизирующие, цитопротективные свойства [Серебряная, Корнева, 2009; Будяков, 2010; Пикуза и др., 2010; Филатов и др., 2013].

- Ликопид (ЛИ) (ЗАО «Пептек», Россия) (глюкозаминилмурамилдипептид – синтетический аналог структурного фрагмента оболочки (пептидогликана) бактериальных клеток) относится к иммуномодуляторам последнего (III) поколения, активирует врожденный и приобретенный иммунитет и оказывает антиинфекционное, противовоспалительное, репарационное, лейкопоэтическое, противоопухолевое, детоксицирующее и гепатопротекторное действие. Глюкозаминилмурамилдипептид, на основе которого создан ликопид, - молекула, которая представляет собой природную модель иммуностимулятора - минимальный фрагмент оболочки всех микробов, способный вызывать иммунный ответ. Иммунная система подготовлена к встрече с таким естественным адьювантом. Ликопид является лекарственным средством с доказанной во многих клинических испытаниях высокой безопасностью, с изученным механизмом действия, имитирующим естественный процесс обнаружения антигена в организме. Охарактеризованы клеточные молекулы, с которыми он связывается при попадании во внутреннюю среду организма, а также установлен весь путь активации клетки после его контакта с рецепторами врожденного иммунитета. Препарат вызывает повышение функциональной активности нейтрофилов и моноцитов/макрофагов, что проявляется в усилении их фагоцитирующей и цитотоксической способности, увеличивает активность NK-клеток и Т-лимфоцитов. Под влиянием ликопида происходит повышение синтеза различных цитокинов, принимающих участие в регуляции клеточного и

гуморального иммунного ответа. Соединения на основе глюкозаминилмурамилдипептида применяют не только в качестве иммуномодулирующих препаратов, но и адъювантов для вакцин [Пинегин, Пащенко, 2019; Ушкалова и др., 2019; Гурьянова, Хаитов, 2020; Маркова и др., 2020].

Таким образом, учитывая вышеизложенное, можно сделать вывод о том, что данные иммуномодуляторы, относящиеся к разным группам адъювантов, стимулируют местный и системный гуморальный иммунный ответ, который является ведущим механизмом в формировании противохолерного иммунитета, что соответствует целям данного исследования. Экспериментальное обоснование целесообразности применения иммуномодуляторов для повышения иммуногенных и протективных свойств единственной зарегистрированной в России холерной вакцины будет полезно для разработки новых подходов к совершенствованию профилактических препаратов против этой инфекции, что свидетельствует о перспективности данного научного направления.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Бактериальные штаммы

Для заражения животных использовали штамм *Vibrio cholerae classical* 569В.

2.2 Материалы

2.2.1 Экспериментальные животные

В работе были использованы 800 беспородных белых мышей обоих полов (весом 16 – 20 г в возрасте 6 недель (начало эксперимента) и 10 недель (окончание эксперимента)) и 120 взрослых кроликов 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)), полученных из питомника ФКУЗ Ростовский противочумный институт Роспотребнадзора.

Животных содержали согласно ГОСТу 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур». Экспериментальные животные находились в специальных клетках в хорошо проветриваемых помещениях с приточно-вытяжной вентиляцией, с достаточным искусственным и естественным освещением при температуре 19-23°C при влажности 50-70%. (взрослые кролики по одной особи в клетке, белые мыши - по 10 особей). Перед началом эксперимента выдерживали карантин в течение недели. Животные были обеспечены достаточным количеством чистой воды и сертифицированных кормов, сбалансированных по аминокислотному составу, содержанию протеина, жира и витаминов.

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).

Забор материала осуществляли в первую половину рабочего дня.

Перед взятием материала, соблюдая правила гуманного обращения с экспериментальными животными, беспородным белым мышам внутрибрюшинно вводили тиопентал натрия (1% р-р, 2,0 мл), взрослым кроликам при моделировании экспериментальной холеры делали внутримышечно инъекцию ксилозина (из расчета 0,15 мл на 1 кг веса). После окончания экспериментов животных эвтаназировали хлороформом.

2.2.2 Иммунопрепараты

Вакцина холерная бивалентная химическая, таблетки (ФКУН Российского научно-исследовательского противочумного института "Микроб" Роспотребнадзора).

Иммуномодуляторы:

- 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;

- Ликопид (ЛИ) (ЗАО «Пептек», Россия) (глюкозаминилмурамилдипептид – синтетический аналог структурного фрагмента оболочки (пептидогликана) бактериальных клеток) – таблетки по 10 мг.

2.3 Методы

2.3.1 Иммунизация животных

Пероральную иммунизацию взрослых кроликов проводили с помощью зонда, беспородных белых мышей - с помощью хирургических игл с насаженными на них полиэтиленовыми оливами. Перед иммунизацией

экспериментальных животных поили 5% раствором пищевой соды (взрослых кроликов – по 2 мл, белых мышей - по 0,1 мл) для снижения повреждающего действия желудочного сока на противохолерную вакцину и сразу после этого однократно перорально иммунизировали. Вакцину предварительно 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. Животным контрольных групп вводили ЗФР (рН 7,2) в том же объеме.

2.3.2 Введение иммуномодуляторов

Одновременно с вакциной экспериментальным животным однократно вводили иммуномодуляторы, дозу которых рассчитывали, исходя из человекодозы, рекомендованной производителями: ПО внутримышечно - взрослому кролику - 0,17 мг, белой мыши – 1,7 мкг; ДЕ внутримышечно - взрослому кролику – 2,0 мг, белой мыши – 20,0 мкг; ЛИ перорально - взрослому кролику – 0,285 мг, белой мыши – 2,85 мкг. Для этого препараты разводили в ЗФР (рН 7,2). ПО и ДЕ кололи внутримышечно во внутреннюю поверхность бедра задней лапы животных. ЛИ давали перорально кроликам, используя зонд, белым мышам - с помощью хирургических игл с насаженными на них полиэтиленовыми оливами. Животным контрольных групп вводили ЗФР (рН 7,2) в том же объеме и тем же способом.

2.3.3 Оценка эффективности сочетанного применения иммуномодуляторов и противохолерной вакцины

Оценку влияния иммунокоррекции на формирование противохолерного иммунного ответа проводили на первой, второй и третьей неделе поствакцинального периода.

Способность ПО, ЛИ, ДЕ повышать протективную активность вакцины холерной бивалентной химической таблетированной оценивали на

модели беспородных белых мышей через месяц и на модели взрослых кроликов через месяц и семь месяцев после вакцинации, заражая экспериментальных животных культурой вирулентного штамма *V. cholerae classical* 569B.

2.3.4 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). Жизнеспособность спленоцитов определяли в автоматическом счетчике клеток «Countess™», окрашивая их 0,2% трипановым синим. Суспензия содержала 90-96% жизнеспособных лимфоцитов.

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 охлаждённую 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 объёмом 20 мл на слой градиента фиколл-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 подсчёте окрашенных мазков) трижды отмывали охлаждённой средой путём центрифугирования при 100g в течение 7-10 мин, суспендировали в среде с 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Затем отбирали аликвоту для подсчёта клеток и определения их жизнеспособности с помощью окрашивания 0,2% трипановым синим в

автоматическом счетчике клеток «Countess™». Приготовленная таким способом суспензия клеток содержала 96-98% жизнеспособных лимфоцитов.

2.3.5 Определение популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов

Популяции и субпопуляции лимфоцитов определяли 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).

2.3.6 Определение профиля цитокинов

Свежую кровь белых 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 2×10^7 /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. В микропланшеты, сорбированные антителами, специфичными к изучаемым цитокинам, добавляли по 100 мкл стандартов и образцов и инкубировали 1 час при 37°C. Удаляли жидкость и, не промывая, добавляли по 100 мкл рабочего раствора детектирующего реагента А в каждую лунку, после чего инкубировали в течение часа при температуре 37°C. Сливали жидкость и трижды промывали каждую лунку

350 мл промывающего раствора. После этого добавляли в каждую лунку по 100 мкл рабочего раствора детектирующего реагента В и инкубировали 30 мин при температуре 37°C. Затем удаляли жидкость и пять раз промывали каждую лунку 350 мл промывающего раствора. После чего вносили по 90 мкл ТМБ, заклеивали плёнкой для планшета и инкубировали в темноте 10-20 минут при температуре 37°C. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл стоп-реагента. Учет результатов производили на комбинированном ридере «Synergy™ 2» для работы в микропланшетном формате при длине волны 450 нм. Концентрацию цитокинов в образцах рассчитывали в соответствии со стандартными кривыми (табл. 1).

Таблица 1. Показатели стандартной кривой для определения концентрации цитокинов, секретируемых иммунокомпетентными клетками периферической крови белых мышей

ИФ-γ		ФНО-α		ИЛ-4		ИЛ-10	
пг/мл	оптическая плотность	пг/мл	оптическая плотность	пг/мл	оптическая плотность	пг/мл	оптическая плотность
15,6	0,091	15,6	0,086	7,8	0,157	7,8	0,075
32,1	0,187	32,1	0,158	15,6	0,268	15,6	0,131
62,5	0,324	62,5	0,286	32,1	0,456	32,1	0,251
125	0,650	125	0,511	62,5	0,782	62,5	0,501
250	1,123	250	1,010	125	1,231	125	0,853
500	1,864	500	1,730	250	1,782	250	1,554
1000	2,867	1000	3,121	500	2,632	500	2,732

2.3.7 Определение поверхностных маркеров активации лимфоцитов

Экспрессию 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).

2.3.8 Определение общего количества антителообразующих клеток пейеровых бляшек

Количество антителообразующих клеток (АОК) пейеровых бляшек определяли с помощью метода иммуноферментных зон ELISPOT [Russell et al., 1987]. Для этого лунки пластиковых панелей Costar (Нидерланды) сенсibilizировали антигеном (убитая кипячением суточная культура *V. cholerae* O1) 12 час при 37°C в присутствии 0,2% глутарового альдегида. Лимфоциты ресуспендировали при +4°C в среде с 5% эмбриональной сывороткой теленка и по 10^5 вносили в каждую лунку. Панель инкубировали в течение ночи в CO₂-инкубаторе, затем трижды промывали с помощью ЗФР-твин 20 при +4°C. Вносили антиглобулиновый пероксидазный конъюгат антител козы к IgG, А, М мыши (Имтек, Россия) и оставляли на 1 час при комнатной температуре. В качестве субстрата использовали 2% о-дианизидин в абсолютном этаноле с 0,006% H₂O₂. Учет проводили с помощью микроскопа, по числу коричневых колец или пятен, соответствовавших месторасположению АОК.

2.3.9 Определение количества секреторного иммуноглобулина А

Определение количества секреторного иммуноглобулина А (sIgA) проводили 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. Количество sIgA рассчитывали в соответствии со стандартной кривой (табл. 2).

Таблица 2. Показатели стандартной кривой для определения количества sIgA в промывных водах тонкого кишечника белых мышей

нг/мл	0,156	0,312	0,625	1,25	2,5	5	10
оптическая плотность	0,121	0,201	0,395	0,601	1,192	1,786	2,784

2.3.10 Определение общего пула противохолерных антител

Общий пул 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 10^8 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, М кролика (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 TM2» 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].

2.3.11 Моделирование холеры на экспериментальных животных

Метод получения генерализованной инфекции на белых мышах
[МУ 3.3.1.2075-06. 3.3.1.]

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

Модель изолированной петли тонкого кишечника взрослого кролика [Burrows, Sack, 1974]

Животных (кролики) после иммунизации и контрольной группы выдерживали без пищи 24 часа. После введения миорелаксанта ксилозина (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 ЗФР (контрольная петля), в другую – 1 мл ЗФР, содержащий 1×10^9 клеток

18-часовой культуры вирулентного штамма *V. cholerae classical* 569В (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:

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

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

2.3.12 Статистическая обработка результатов исследований

Статистический анализ материалов 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, согласно которой: слабая — от 0,1 до 0,3; умеренная — от 0,3 до 0,5; заметная — от 0,5 до 0,7; высокая — от 0,7 до 0,9; весьма высокая (сильная) — от 0,9 до 1,0. Отличия считали значимыми при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

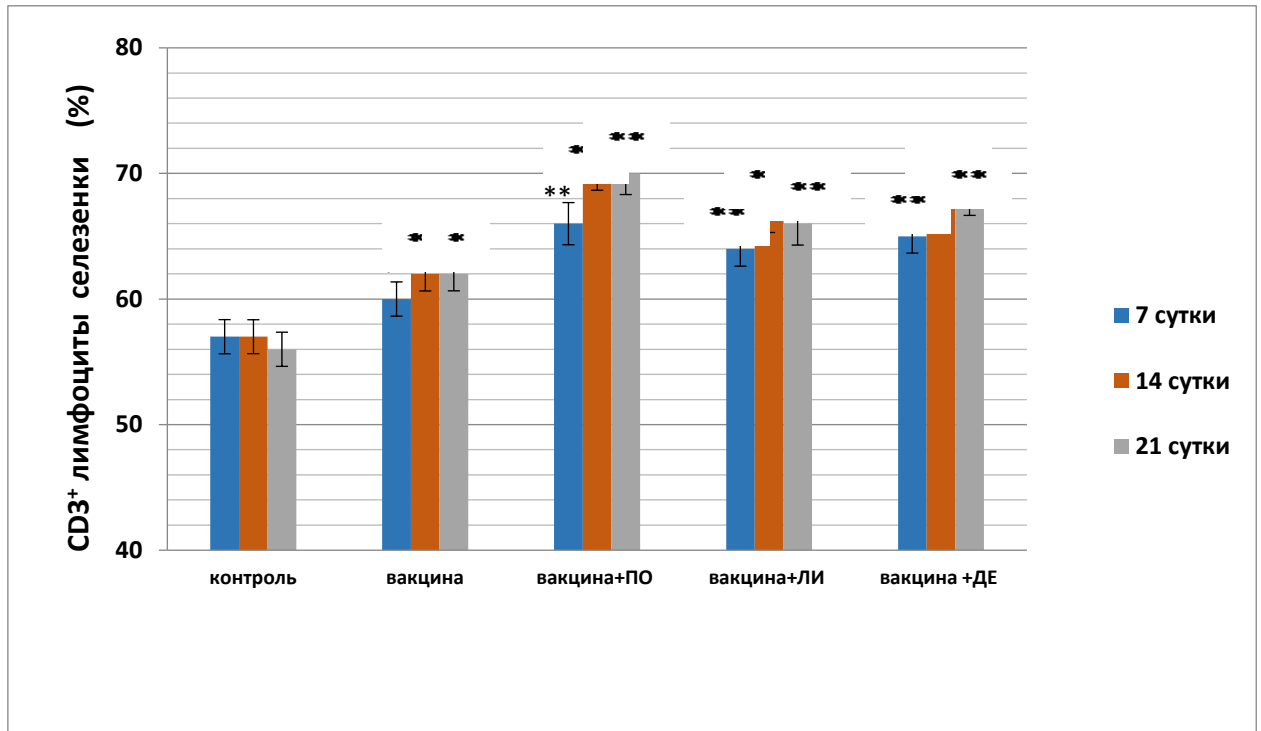
3.1 Изучение влияния полиоксидония, ликопида, дерината на иммуногенную активность вакцины таблетированной холерной бивалентной химической

3.1.1 Влияние иммуномодуляторов на популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов вакцинированных животных

Учитывая, что вакцинация индуцирует в макроорганизме процесс формирования популяций антигенспецифических Т- и В-лимфоцитов, готовых впоследствии элиминировать антиген, а также вызывает количественное перераспределение популяций и субпопуляций этих клеток, было изучено влияние иммуномодуляторов на количественный и качественный состав лимфоцитов вакцинированных мышей.

При исследовании влияния вакцинации на популяционный состав Т-клеток селезенки и пейровых бляшек (ПБ) выявлено достоверное увеличение ($p < 0,05$) относительного числа $CD3^+$ лимфоцитов селезенки по сравнению с интактными животными ($60 \pm 1,0$ и $57 \pm 1,0$, соответственно), а также Т-клеток ПБ – ($62 \pm 1,6$ и $54 \pm 1,8$, соответственно), начиная с 7 суток поствакцинального периода.

Полиоксидоний (ПО), ликопид (ЛИ) и деринат (ДЕ) стимулировали относительное содержание Т- лимфоцитов в селезенке животных опытных групп ($66 \pm 1,6$; $64 \pm 1,24$; $65 \pm 1,34$, соответственно) по сравнению с вакцинированными мышами ($60 \pm 1,36$) с конца первой недели поствакцинального периода (рис. 1) и до конца срока наблюдения ($70 \pm 1,68$; $66 \pm 1,7$; $68 \pm 1,34$, соответственно).



Примечание:

ПО - полиоксидоний, ЛИ – ликопид, ДЕ – деринат.

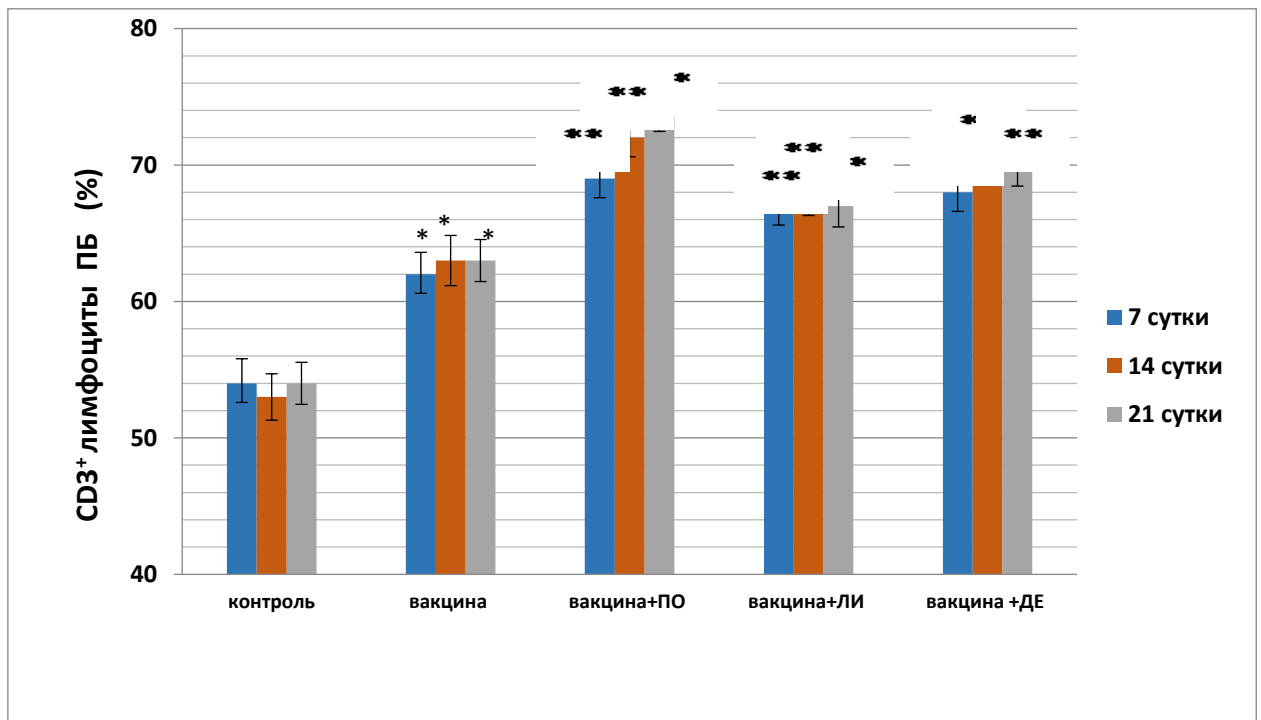
Данные представлены в виде $M \pm SD$; $n=10$ в каждой группе;

* - 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

Рисунок 1. Влияние иммуномодуляторов на относительное содержание $CD3^+$ лимфоцитов селезенки у вакцинированных мышей

Применение иммуномодуляторов (ПО, ЛИ, ДЕ) вызывало достоверное увеличение ($p<0,05$) относительного количества $CD3^+$ лимфоцитов в ПБ вакцинированных животных, регистрируемое на 7 сутки наблюдения ($69 \pm 1,8$, $67 \pm 1,5$, $68 \pm 1,4$, соответственно) по сравнению с этими показателями белых мышей, получивших только вакцину ($62 \pm 1,6$) (рис. 2). Такая же тенденция наблюдалась и в течение третьей недели эксперимента ($74 \pm 1,8$; $67 \pm 1,7$; $70 \pm 1,4$, соответственно).



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;

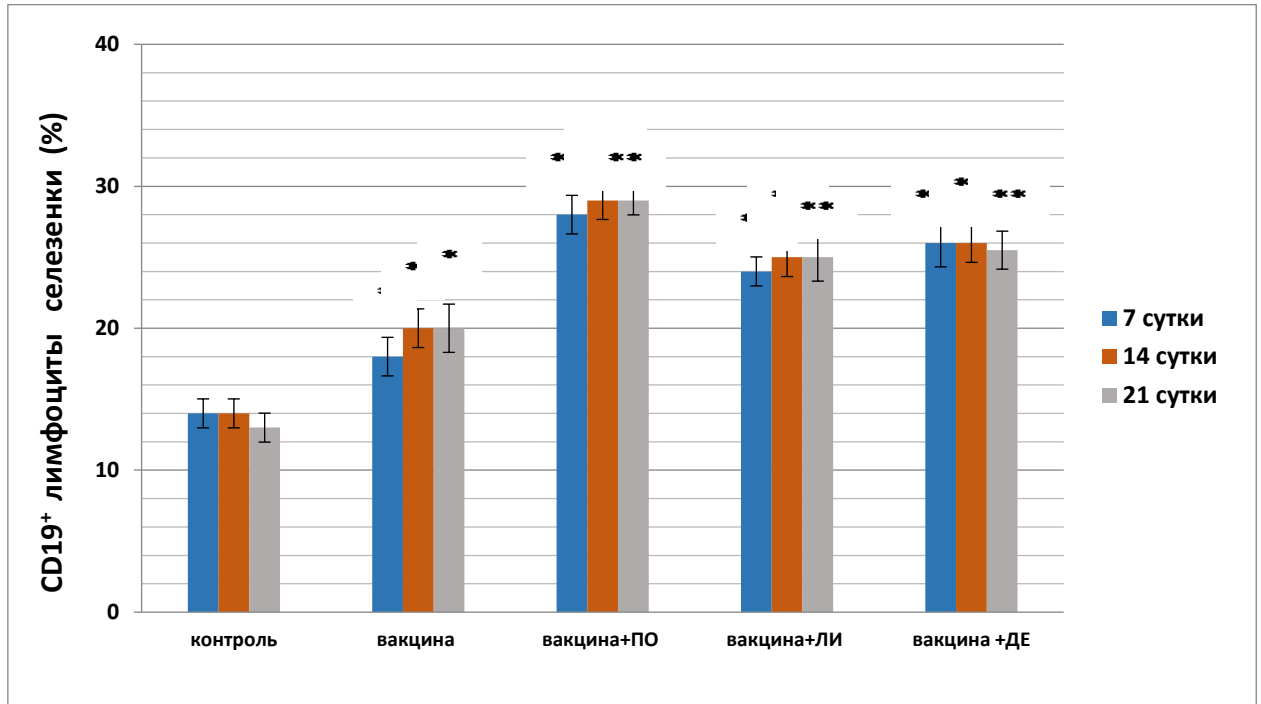
** - достоверное различие ($p<0,05$) по отношению к аналогичным показателям у вакцинированных животных

Рисунок 2. Влияние иммуномодуляторов на относительное количество $CD3^+$ лимфоцитов в пейеровых бляшках вакцинированных мышей

При определении количества В-клеток у вакцинированных мышей выявлено усиление их относительного содержания на первой неделе в селезенке ($18 \pm 1,36$) и ПБ ($19 \pm 1,6$) и до конца третьей недели поствакцинального периода в селезенке ($20 \pm 1,7$) и ПБ ($21 \pm 1,7$), по сравнению с интактными животными ($14 \pm 1,02$ и $14 \pm 1,2$, соответственно).

У животных опытных групп, получавших при вакцинации ПО, ЛИ и ДЕ, с конца первой недели наблюдения регистрировалось значительное увеличение процентного содержания $CD19^+$ лимфоцитов как в селезенке ($28 \pm 1,36$; $24 \pm 1,02$; $26 \pm 1,68$, соответственно), так и в ПБ ($29 \pm 1,3$; $24 \pm 1,2$; $26 \pm 1,6$, соответственно), по сравнению с группой вакцинированных мышей

($18 \pm 1,36$ и $19 \pm 1,6$, соответственно) (рис. 3, 4). В конце эксперимента наблюдалась такая же тенденция.



Примечание:

ПО - полиоксидоний, ЛИ – ликолипид, ДЕ – деринат.

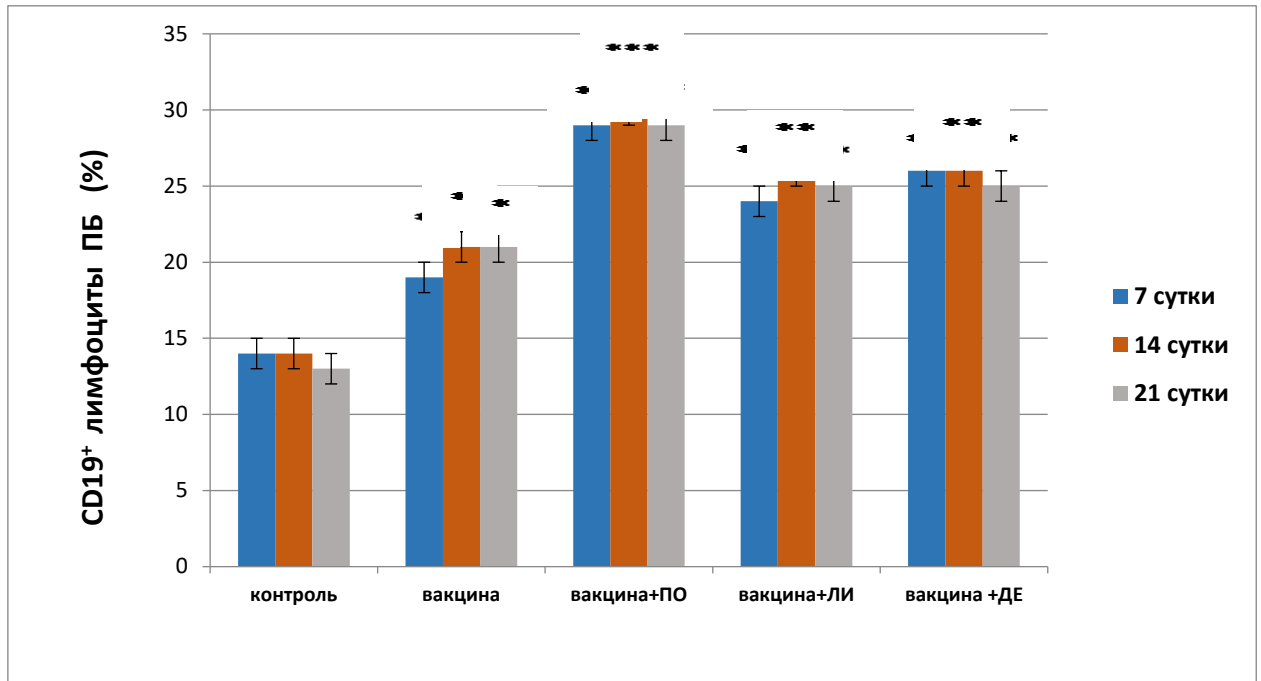
Данные представлены в виде $M \pm SD$; $n=10$ в каждой группе;

* - 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.

Рисунок 3. Влияние иммуномодуляторов на относительное содержание В-лимфоцитов в селезенке вакцинированных мышей

При этом ПО, по сравнению с другими иммуномодуляторами, в большей степени ($p < 0,05$) стимулировал относительное число В-клеток в ПБ ($30 \pm 1,4$; $25 \pm 1,06$; $25 \pm 1,1$, соответственно) и в селезенке ($29 \pm 1,0$; $25 \pm 1,08$; $26 \pm 1,0$, соответственно) (рис. 4).



Примечание:

ПО - полиоксидоний, ЛИ – ликолипид, ДЕ – деринат.

Данные представлены в виде $M \pm SD$; $n=10$ в каждой группе;

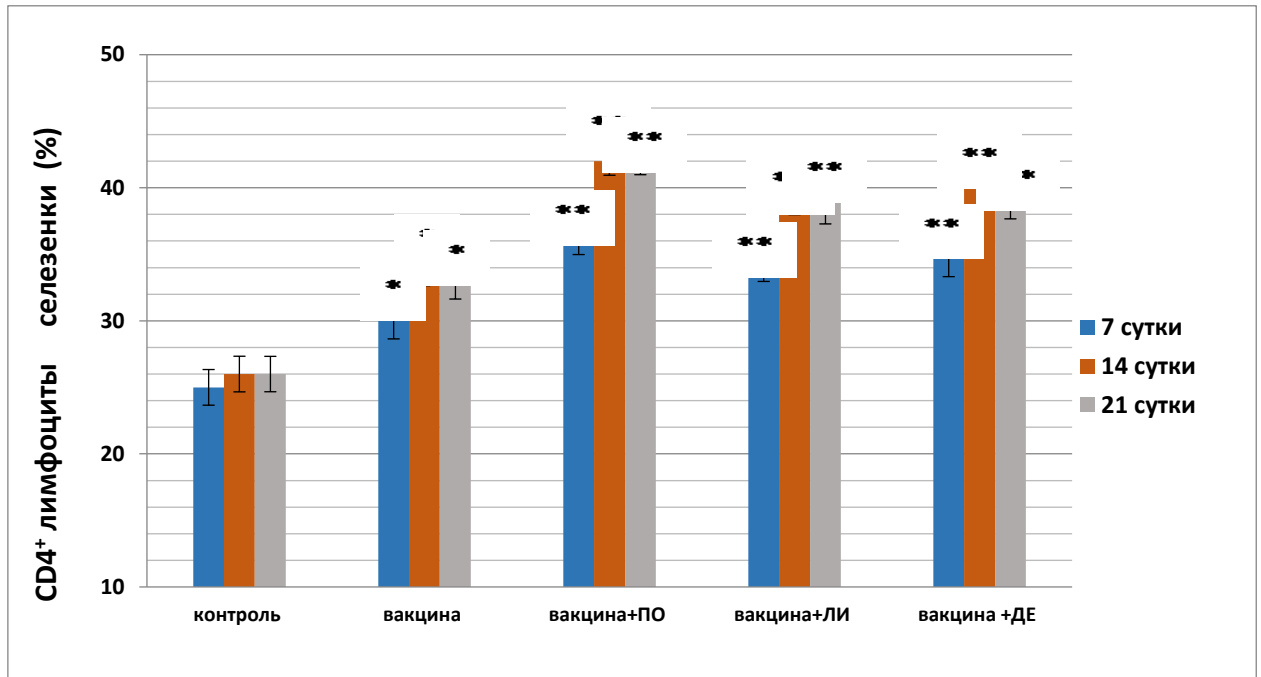
* - достоверное различие ($p<0,05$) по отношению к данному показателю у интактных животных;

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

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

Рисунок 4. Влияние иммуномодуляторов на относительное количество В-лимфоцитов в пейеровых бляшках вакцинированных мышей

При изучении субпопуляционного состава Т-клеток селезенки и ПБ у вакцинированных экспериментальных животных установлено увеличение относительного числа $CD4^+$ лимфоцитов в селезенке ($30 \pm 1,36$) и в ПБ ($33 \pm 1,6$) уже с 7 суток поствакцинального периода по сравнению с контрольными мышами ($25 \pm 1,4$ и $25 \pm 1,04$, соответственно) (рис. 5, 6). Применение всех иммуномодуляторов (ПО, ЛИ и ДЕ) при вакцинации стимулировало, начиная с 7 суток, этот процесс в селезенке ($36 \pm 1,02$; $34 \pm 1,04$; $35 \pm 1,7$, соответственно), сохраняя относительное количество T_h на высоком уровне до конца срока наблюдения ($42 \pm 1,2$; $39 \pm 1,72$; $39 \pm 1,4$, соответственно), по сравнению с группой вакцинированных животных ($33 \pm 1,06$) (рис. 5).



Примечание:

ПО - полиоксидоний, ЛИ – ликолипид, ДЕ – деринат.

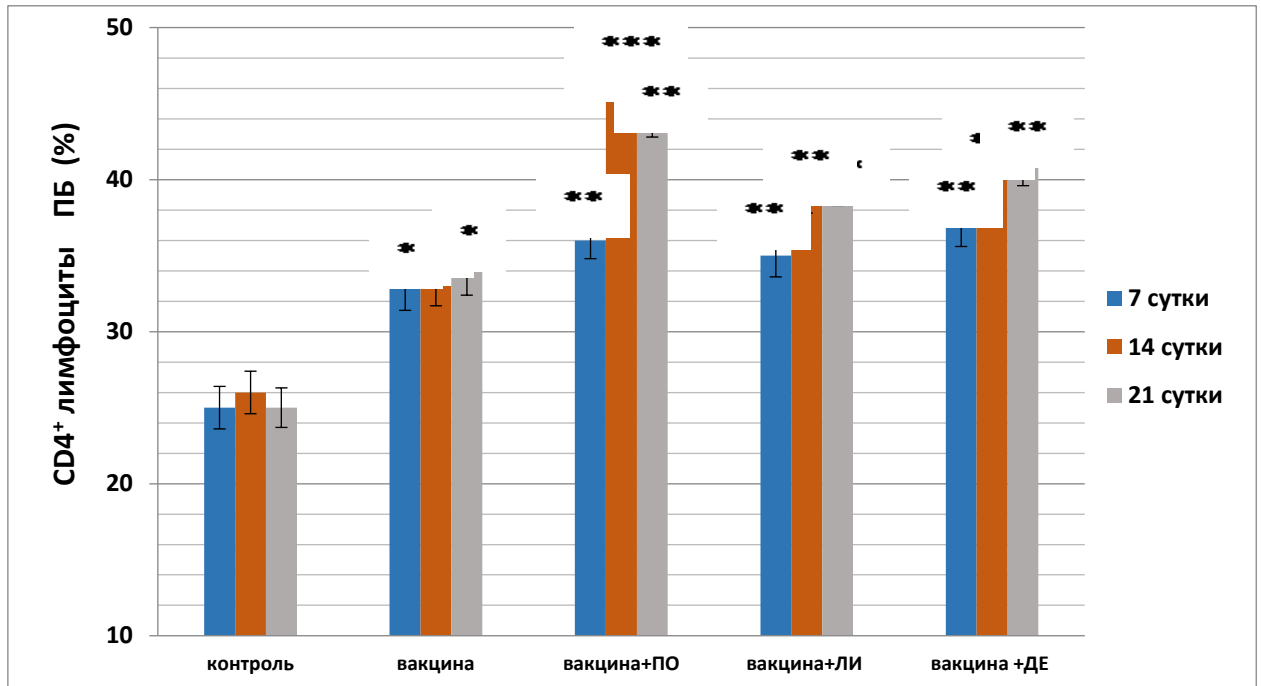
Данные представлены в виде $M \pm SD$; $n=10$ в каждой группе;

* - 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

Рисунок 5. Влияние иммуномодуляторов на относительное содержание $CD4^+$ лимфоцитов в селезенке вакцинированных мышей

В ПБ иммуномодуляторы, особенно ПО, увеличивают, по сравнению с группой вакцинированных животных ($33 \pm 1,3$), относительное количество T_h , начиная с 14-х суток (ПО $46 \pm 1,6$; ЛИ $39 \pm 1,2$; ДЕ $40 \pm 1,3$) и до конца третьей недели поствакцинального периода (ПО $44 \pm 1,0$; ЛИ $40 \pm 1,6$; ДЕ $41 \pm 0,9$) (рис. 6).



Примечание:

ПО - полиоксидоний, ЛИ – ликолипид, ДЕ – деринат.

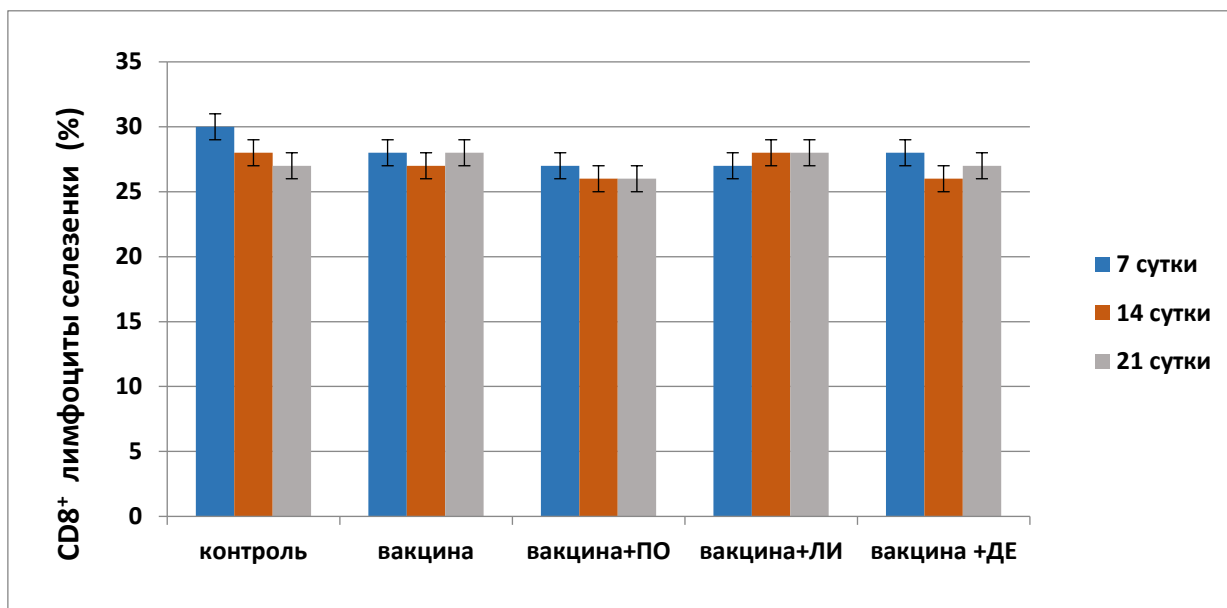
Данные представлены в виде $M \pm SD$; $n=10$ в каждой группе;

* - 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 у вакцинированных животных с другими иммуномодуляторами

Рисунок 6. Влияние иммуномодуляторов на относительное количество $CD4^+$ лимфоцитов в пейеровых бляшках вакцинированных мышей

Оценка влияния иммуномодуляторов на субпопуляцию $CD8^+$ клеток у вакцинированных мышей не выявила достоверного увеличения ($p > 0,05$) их относительного количества в селезенке (вакцина $28 \pm 1,36$; ПО $27 \pm 1,68$; ЛИ $28 \pm 1,31$; ДЕ $28 \pm 1,34$) и ПБ (вакцина $24 \pm 1,6$; ПО $22 \pm 1,6$; ЛИ $23 \pm 1,3$; ДЕ $24 \pm 1,3$) у всех опытных групп животных по сравнению с контрольной группой: в селезенке - $30 \pm 1,7$; в ПБ - $26 \pm 1,08$ (рис. 7, 8).

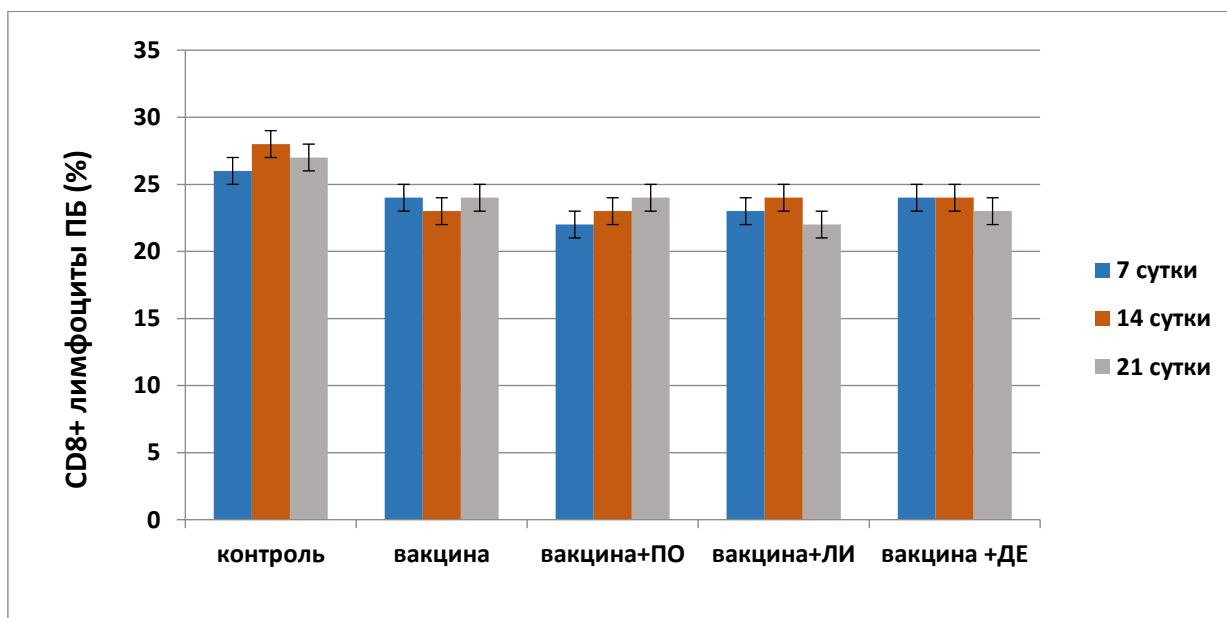


Примечание:

ПО - полиоксидоний, ЛИ – ликолипид, ДЕ – деринат.

Данные представлены в виде $M \pm SD$; $n=10$ в каждой группе

Рисунок 7. Влияние иммуномодуляторов на относительное содержание $CD8^+$ лимфоцитов в селезенке вакцинированных мышей



Примечание:

ПО - полиоксидоний, ЛИ – ликолипид, ДЕ – деринат.

Данные представлены в виде $M \pm SD$; $n=10$ в каждой группе

Рисунок 8. Влияние иммуномодуляторов на относительное количество $CD8^+$ лимфоцитов в пейеровых бляшках вакцинированных мышей

Таким образом, сочетанное применение иммуномодуляторов и вакцины приводит к увеличению, по сравнению с контрольными и вакцинированными животными, относительного числа $CD3^{+}$ - и $CD19^{+}$ лимфоцитов селезенки и ПБ уже на первой неделе поствакцинального периода. Иммуномодуляторы положительно влияют на содержание $CD4^{+}$ лимфоцитов, сохраняя их относительное количество на уровне, превышающем таковой у контрольных и вакцинированных мышей, в течение трех недель эксперимента.

3.1.2 Изучение продукции цитокинов иммунокомпетентными клетками периферической крови вакцинированных белых мышей и оценка влияния иммуномодуляторов на этот процесс

Цитокины играют ключевую роль в регуляции врожденного и специфического иммунитета, особенно в процессах, связанных с пролиферацией и дифференцировкой Т- и В- лимфоцитов.

В предыдущем разделе было показано, что увеличение числа Т-клеток в селезенке и ПБ обусловлено увеличением относительного содержания субпопуляции $CD4^{+}$ лимфоцитов, дифференциация которых на Th1 и Th2 и их соотношение определяет преимущественное направление развития иммунных процессов в сторону формирования клеточного или гуморального иммунного ответа. Учитывая, что Th1 и Th2 продуцируют разный спектр цитокинов, были изучены уровни регуляторных пептидов, наиболее соответствующих этим субпопуляциям.

Проведенные исследования показали, что иммунокомпетентные клетки периферической крови вакцинированных мышей уже с третьих суток после прививки продуцируют в большем количестве противовоспалительные цитокины ИЛ-4, ИЛ-10, характерные для Th2 типа иммунного ответа (табл. 3).

Таблица 3 - Продукция цитокинов (пг/мл) иммунокомпетентными клетками периферической крови вакцинированных мышей на третьи сутки поствакцинального периода ($M \pm SD$)

Продукция цитокинов:		Группы животных:				
		контрольные (n=10)	вакцинированные (n=10)	вакцинированные +ПО (n=10)	вакцинированные +ЛИ (n=10)	вакцинированные +ДЕ (n=10)
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 – ликолипид, ДЕ – деринат.

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

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

Таблица 4 - Продукция цитокинов (пг/мл) иммунокомпетентными клетками периферической крови вакцинированных мышей на седьмые сутки после прививки ($M \pm SD$)

Продукция цитокинов:		Группы животных:				
		контрольные (n=10)	вакцинированные (n=10)	вакцинированные +ПО (n=10)	вакцинированные +ЛИ (n=10)	вакцинированные +ДЕ (n=10)
ИФ- γ	спонтанная	45,6 \pm 2,4	47,9 \pm 3,4	56,6 \pm 2,9	52,9 \pm 2,2	58,9 \pm 2,4
	Кон А	66,4 \pm 4,5	69,2 \pm 2,3	70,2 \pm 3,3	68,2 \pm 4,3	71,2 \pm 4,3
ФНО- α	спонтанная	3,1 \pm 0,9	6,6 \pm 2,2	5,9 \pm 2,1	6,6 \pm 1,9	7,6 \pm 2,2
	Кон А	5,6 \pm 1,2	7,2 \pm 1,3	9,9 \pm 2,2	8,9 \pm 2,4	10,9 \pm 3,3
ИЛ-4	спонтанная	9,4 \pm 2,0	18,7 \pm 1,1*	36,5 \pm 2,4* ** ***	32,7 \pm 1,6* ** ***	38,5 \pm 2,9* ** ***
	Кон А	15,7 \pm 2,8	27,4 \pm 2,1*	39,8 \pm 2,2* ** ***	38,4 \pm 2,4* ** ***	40,5 \pm 2,5* ** ***
ИЛ-10	спонтанная	13,1 \pm 2,7	37,7 \pm 3,6*	50,7 \pm 3,8* ** ***	51,2 \pm 2,4* ** ***	49,7 \pm 3,0* ** ***
	Кон А	19,6 \pm 3,0	46,2 \pm 3,4*	56,7 \pm 3,0* ** ***	58,6 \pm 3,0* ** ***	56,7 \pm 2,8* ** ***

Примечание:

ПО - полиоксидоний, ЛИ – ликолипид, ДЕ – деринат.

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

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

***- достоверное отличие от аналогичных показателей на третьи сутки после прививки ($p < 0,05$)

Такая же тенденция была выявлена при изучении цитокинового профиля у вакцинированных животных, получавших иммуномодуляторы. У всех групп опытных животных было зарегистрировано увеличение секреции ИЛ-4 и ИЛ-10. Следует отметить, что иммуномодуляторы стимулировали цитокинпродуцирующую активность лимфоцитов вакцинированных животных примерно на одном уровне.

На седьмые сутки уровень синтеза ИЛ-4 и ИЛ-10 у вакцинированных животных не изменился, по-прежнему превышая таковой у мышей контрольной группы (табл. 4). У животных, получавших при иммунизации иммуноперпараты, выявлено достоверное увеличение продукции этих цитокинов, по сравнению с предыдущим сроком исследования.

Таким образом, противохолерная вакцинация вызывает в организме привитых животных увеличение продукции противовоспалительных цитокинов, а иммуномодуляторы усиливают этот процесс.

3.1.3 Оценка экспрессии поверхностных маркеров активации лимфоцитов у вакцинированных животных

В процессе созревания, активации, функциональной активности и, наконец, гибели лимфоцитов на их поверхности экспрессируются молекулы, характерные для того или иного состояния иммунокомпетентных клеток: активации (ранней и поздней), пролиферации и апоптоза. Скрининг и определение роли наиболее важных поверхностных антигенов, экспрессирующихся на лимфоцитах в норме и при патологии, является перспективным направлением в современной иммунологии [Литвинова, 2014].

Для оценки состояния иммунокомпетентных клеток вакцинированных животных оценивали маркеры ранней ($CD38^+$, $CD69^+$) и поздней ($CD23^+$) активации, экспрессирующиеся как на Т-, так и на В-клетках.

Выявлено, что противохолерная вакцинация способствует достоверному увеличению ($p < 0,05$) относительного количества клеток с маркером CD69⁺ в периферической крови беспородных белых мышей уже с 3 суток после прививки. Через 7 суток и до конца третьей недели после вакцинации регистрировалось достоверное снижение экспрессии CD69⁺ у животных этой группы (табл. 5).

Таблица 5 - Оценка экспрессии CD69⁺ на мембранах иммунокомпетентных клеток периферической крови вакцинированных мышей и влияния иммуномодуляторов на этот процесс (M ± SD)

Группы животных:	Количество (%) клеток с CD69 ⁺ через:				
	3 дня после вакцинации	5 дней после вакцинации	7 дней после вакцинации	14 дней после вакцинации	21 день после вакцинации
вакцинированные (n=10)	26,6±2,1*	23±2,3*	19,5±1,9*	20,0±1,6*	20,4±1,4*
вакцинированные + ПО (n=10)	46,5±2,8* **	44,0±2,8* **	34,4±2,1* ** ***	32,1±2,8* **	31,8±1,9* **
вакцинированные + ДЕ (n=10)	36,4±1,9* ** ****	32,0±2,6* ** ****	26,5±2,4* ** *** ****	24,6±2,0* ****	23,4±2,6* ****
вакцинированные + ЛИ (n=10)	42,9±2,3* **	39,1±2,1* **	34,6±1,4* ** ***	33,1±2,4* **	30,1±2,1* **
интактные (n=10)	3,6±1,4				

Примечание:

ПО - полиоксидоний, ЛИ – ликолипид, ДЕ – деринат.

* - 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 у животных одной группы;

****- достоверное различие (p<0,05) по отношению к аналогичным показателям у животных, получавших разные иммунопрепараты

Следует отметить, что количество этих молекул активации во все сроки наблюдения было достоверно выше ($p < 0,05$), чем у интактных животных.

Выявлено, что все изученные иммуномодуляторы стимулируют этот процесс, но в разной степени. В большей степени, по сравнению с вакцинированными животными, регистрировалась экспрессия CD69⁺ на иммунокомпетентных клетках у животных, которые при вакцинации получали ПО и ЛИ. Наибольшее относительное содержание клеток с маркером CD69⁺ выявлялось с 3 по 5 сутки исследования, затем с 7 суток достоверно снижалось ($p < 0,05$), но оставалось выше, чем у интактных и вакцинированных животных. У мышей, получавших при вакцинации ДЕ, достоверное по отношению к вакцинированным животным, увеличение процента клеток с CD69⁺ наблюдалось только в течение первой недели после прививки.

Анализ результатов, полученных при оценке экспрессии CD38⁺, показал, что относительное количество клеток с этим маркером у вакцинированных животных по сравнению с контролем достоверно возрастает к концу первой недели после прививки и остается на этом уровне до конца срока наблюдения (табл. 6). Такая же тенденция наблюдалась и при анализе этого показателя у вакцинированных животных, получавших ДЕ. Следует отметить, что показатели статистически не отличались в пределах этих двух групп ($p > 0,05$).

У вакцинированных мышей из группы с ПО, наоборот, относительное число клеток с CD38⁺ достоверно возрастало по отношению к контролю (интактным животным) уже с 3 суток после приема иммунопрепаратов и становилось выше ($p < 0,05$), чем у только вакцинированных животных, к 5 суткам поствакцинального периода. На 7 сутки относительное количество клеток с данным маркером достоверно ($p < 0,05$) увеличилось в сравнении с аналогичным показателем на 5 сутки, и оставалось примерно на таком уровне до конца третьей недели, превышая

относительное число клеток, экспрессирующих CD38⁺, в этот период у вакцинированных мышей.

У экспериментальных животных, получавших при вакцинации ЛИ, увеличение ($p < 0,05$) процента клеток с CD38⁺, по сравнению с группой интактных животных, было зарегистрировано на 5 сутки после прививки. К концу первой недели экспрессия маркера на иммунокомпетентных клетках усилилась и оставалась на этом уровне на 14 и 21 сутки поствакцинального периода. Следует отметить, что во все сроки исследования, относительное количество клеток с CD38⁺ у мышей этой группы статистически не отличалось от данного показателя у вакцинированных животных.

При сравнении влияния иммуномодуляторов на экспрессию данной молекулы выявлено, что ПО в большей степени ($p < 0,05$) стимулирует этот процесс, чем ДЕ и ЛИ.

Анализ результатов, полученных при определении относительного числа клеток с CD23, выявил их увеличение у вакцинированных животных, по сравнению с интактными мышами, к концу второй недели поствакцинального периода (табл. 7). Такой же процент клеток, экспрессирующих CD23⁺, был зарегистрирован у мышей этой группы и на 21 сутки после прививки.

В группах экспериментальных животных, получавших при вакцинации иммуномодуляторы, достоверное усиление экспрессии этого маркера на мембранах иммунокомпетентных клеток, по сравнению с интактными мышами, было обнаружено уже на 7 сутки наблюдения. Особенно стимулировали этот процесс ПО и ЛИ, превышая аналогичный показатель в этот срок у вакцинированных животных, в отличие от ДЕ. Такая тенденция сохранялась до конца эксперимента.

Таблица 6 - Оценка экспрессии CD38⁺ на мембранах иммунокомпетентных клеток периферической крови вакцинированных мышей и влияния иммуномодуляторов на этот процесс (M ± SD)

Группы животных:	Количество (%) клеток с CD38 ⁺ через:				
	3 дня после вакцинации	5 дней после вакцинации	7 дней после вакцинации	14 дней после вакцинации	21 день после вакцинации
вакцинированные (n=10)	12,6±2,8	12,9±2,4	20,6±2,9* ***	26,4±2,8*	26,8±2,8*
вакцинированные + ПО (n=10)	14,3±2,3*	25,3±2,5* ** *** ****	32,6±2,4* ** ****	38,4±2,1* ** ****	37,9±2,0* ** ****
вакцинированные + ДЕ (n=10)	10,5±3,2	12,5±2,2	24,4±1,9* ***	30,5±2,4*	30,4±2,5*
вакцинированные + ЛИ (n=10)	12,4±3,0	17,8±1,2*	26,2±2,4* ***	25,4±2,1*	26,9±2,8*
интактные (n=10)	7,8±1,2				

Примечание:

ПО - полиоксидоний, ЛИ – ликолипид, ДЕ – деринат.

* - 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 иммунопрепараты

Таблица 7 – Оценка экспрессии CD23⁺ на мембранах иммунокомпетентных клеток периферической крови вакцинированных мышей и влияния иммуномодуляторов на этот процесс (M ± SD)

Группы животных:	Количество (%) клеток с CD23 ⁺ через:				
	3 дня после вакцинации	5 дней после вакцинации	7 дней после вакцинации	14 дней после вакцинации	21 день после вакцинации
вакцинированные (n=10)	6,9±1,9	7,0±1,9	10,8±2,4	12,4±1,1*	12,8±2,4*
вакцинированные + ПО (n=10)	7,2±1,8	10,5±2,1	20,5±2,1* ** ***	21,3±1,9* **	21,9±2,5* **
вакцинированные + ДЕ (n=10)	8,7±2,1	9,6±2,0	12,6±2,0* ****	13,5±2,4* ****	15,1±2,5*
вакцинированные + ЛИ (n=10)	8,1±2,1	10,4±1,4	18,4±1,2* ** ***	18,2±1,4* **	19,5±1,6* **
интактные (n=10)	6,3±1,3				

Примечание:

ПО - полиоксидоний, ЛИ – липид, ДЕ – деринат.

* - 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 иммунопрепараты

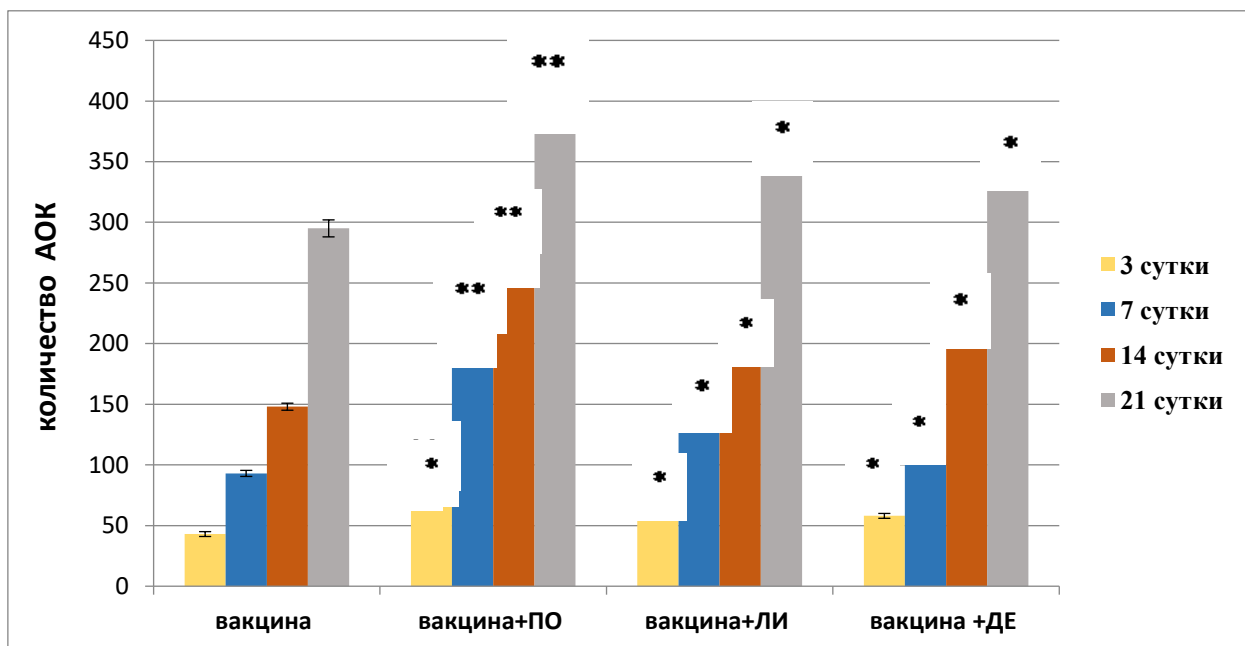
Таким образом, было выявлено увеличение экспрессии CD69⁺, CD38⁺ и CD23⁺ на поверхности иммунокомпетентных клеток периферической крови вакцинированных экспериментальных животных. Введение ПО и ЛИ приводило к повышению относительного числа клеток с CD69⁺, начиная с первых этапов исследования и до конца эксперимента. Под действием ДЕ количество этого рецептора также увеличивалось, но менее интенсивно. Достоверное, по отношению к иммунизированным животным, повышение CD38⁺ наблюдалось только под влиянием ПО, начиная с первой недели и до конца периода наблюдения. В большей степени и более ранние сроки ПО и ЛИ способствовали увеличению у вакцинированных мышей относительного содержания клеток, экспрессирующих на мембранах CD23⁺.

3.1.4 Изучение влияния иммуномодуляторов на количество антителообразующих клеток в процессе формирования противохолерного иммунитета

Интенсивность формирования гуморального мукозального иммунного ответа основывается на анализе количества антигенспецифических антителообразующих клеток (АОК), синтезирующих иммуноглобулины. Учитывая важность этого показателя для оценки формирования гуморального противохолерного иммунного ответа, было изучено наличие АОК у вакцинированных мышей, а также влияние иммуномодуляторов на их количество.

Определение АОК у экспериментальных животных показало, что вакцинация запускает процесс образования этих клеток в ПБ белых мышей. Уже на третьи сутки после иммунизации у мышей опытной группы появлялись АОК, их количество составляло $43 \pm 2,1$, по сравнению с контрольными (интактными) животными, у которых эти клетки не регистрировались. В этот срок у всех иммунизированных животных, получавших иммунопрепараты (ПО, ЛИ и ДЕ), наблюдалось статистически достоверное ($p < 0,05$) увеличение количества антигенспецифических АОК ($77 \pm 2,3$; $60 \pm 2,8$; $58 \pm 2,0$, соответственно), по сравнению с вакцинированными мышами ($43 \pm 2,1$) (рис. 9). Следует отметить, что ПО в большей степени стимулировал этот процесс.

К 7 суткам поствакцинального периода количество АОК под влиянием ПО, ЛИ и ДЕ продолжало увеличиваться ($193 \pm 3,1$; $135 \pm 2,3$; $108 \pm 2,7$, соответственно), по сравнению с вакцинированными мышами ($93 \pm 1,8$), но особенно под влиянием ПО. Такая же тенденция наблюдалась нами и через две недели после прививки. К концу третьей недели наблюдения число антигенспецифических АОК достигло максимального значения у животных из всех опытных групп, но оставалось достоверно выше у мышей, которые получали ПО ($385 \pm 7,1$), чем у тех, кому вводили ЛИ и ДЕ ($355 \pm 7,6$; $339 \pm 8,4$, соответственно).



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 у вакцинированных животных с другими иммуномодуляторами

Рисунок 9. Влияние иммуномодуляторов на количество антителообразующих клеток в пейеровых бляшках вакцинированных мышей

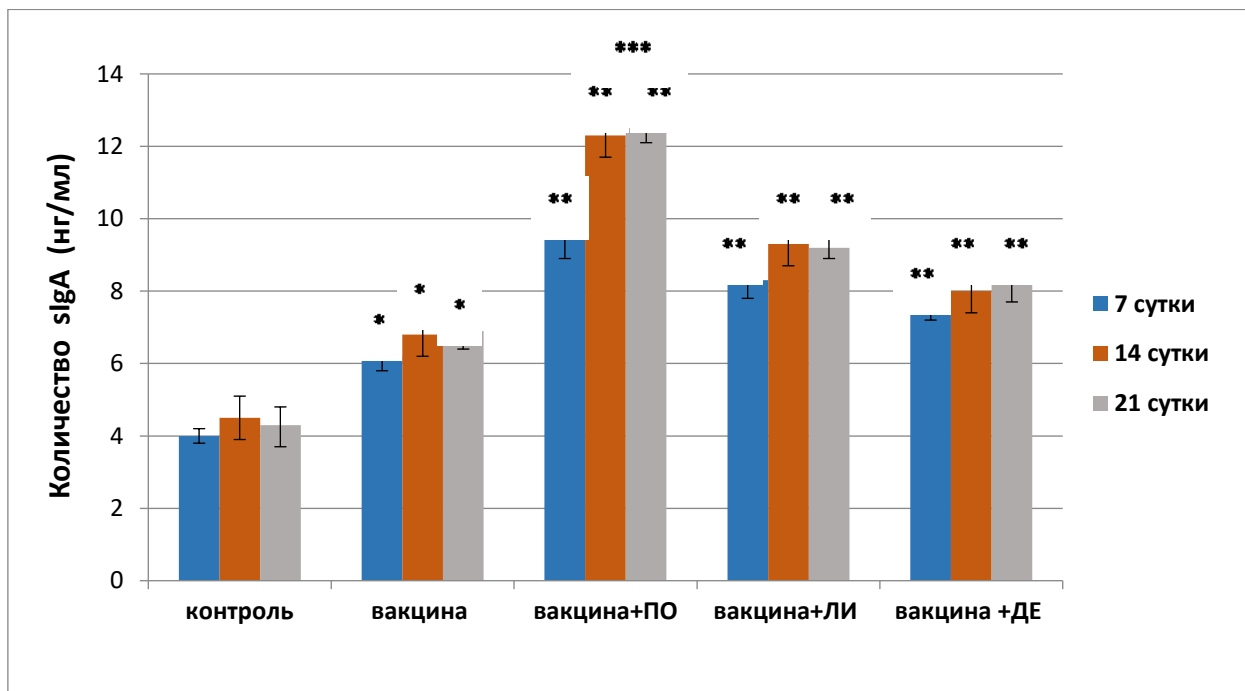
Таким образом, применение иммуномодуляторов способствует увеличению числа АОК в пейеровых бляшках экспериментальных животных. Во все сроки исследования наиболее эффективно стимулирует этот процесс ПО, по сравнению с ЛИ и ДЕ.

3.1.5 Влияние иммуномодуляторов на продукцию секреторного иммуноглобулина А в кишечнике вакцинированных мышей

В настоящее время не вызывает сомнений, что эффективность защиты от холеры связана с формированием напряженного иммунитета слизистых оболочек, ведущую роль в котором играют sIgA. Дефицит sIgA приводит к беспрепятственному проникновению вирусов и бактериальных антигенов, в том числе холерного вибриона, в слизистые оболочки. Учитывая это, была

проведена оценка продукции sIgA в тонком кишечнике вакцинированных белых мышей и изучено влияние иммуномодуляторов на этот процесс.

Установлено, что прививка уже на 7-е сутки вызывала у вакцинированных животных достоверное увеличение продукции sIgA ($6,2 \pm 0,4$), по сравнению с интактными мышами ($4 \pm 0,5$). В конце срока наблюдения количество sIgA оставалось на этом же уровне (рис. 10). У вакцинированных мышей, получавших ПО, ЛИ и ДЕ, синтез sIgA происходил более интенсивно с начала ($9,5 \pm 0,18$; $8,3 \pm 0,11$; $7,5 \pm 0,15$) и до окончания исследования ($12,5 \pm 0,6$; $9,2 \pm 0,3$; $8,2 \pm 0,4$), по сравнению с группой иммунизированных животных ($6,2 \pm 0,4$ и $6,9 \pm 0,4$), что свидетельствует о положительном влиянии иммуномодуляции на этот процесс.



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 у вакцинированных животных с другими иммуномодуляторами

Рисунок 10. Влияние иммуномодуляторов на продукцию sIgA в кишечнике вакцинированных мышей

Следует отметить, что наибольшее количество sIgA зарегистрировано у мышей, получавших ПО, а наименьшее у животных из группы с ДЕ. Такое же соотношение сохранялось и к концу третьей недели поствакцинального периода.

Таким образом, выявлено, что во все сроки наблюдения продукция sIgA в кишечнике вакцинированных мышей под влиянием иммунопрепаратов идет более интенсивно.

Дана оценка наличию/отсутствию корреляции между количеством sIgA и продукцией маркеров ранней и поздней активации на иммунокомпетентных клетках животных опытных групп. Проведенное исследование выявило прямую связь с весьма высокой теснотой ($r=1,000$) между количеством sIgA и CD69 и CD23, а также с высокой силой ($r=0,800$) - с экспрессией CD38 ($p<0,05$). Полученные результаты могут быть полезны в дальнейшем при разработке методов оценки эффективности противохолерной вакцинации.

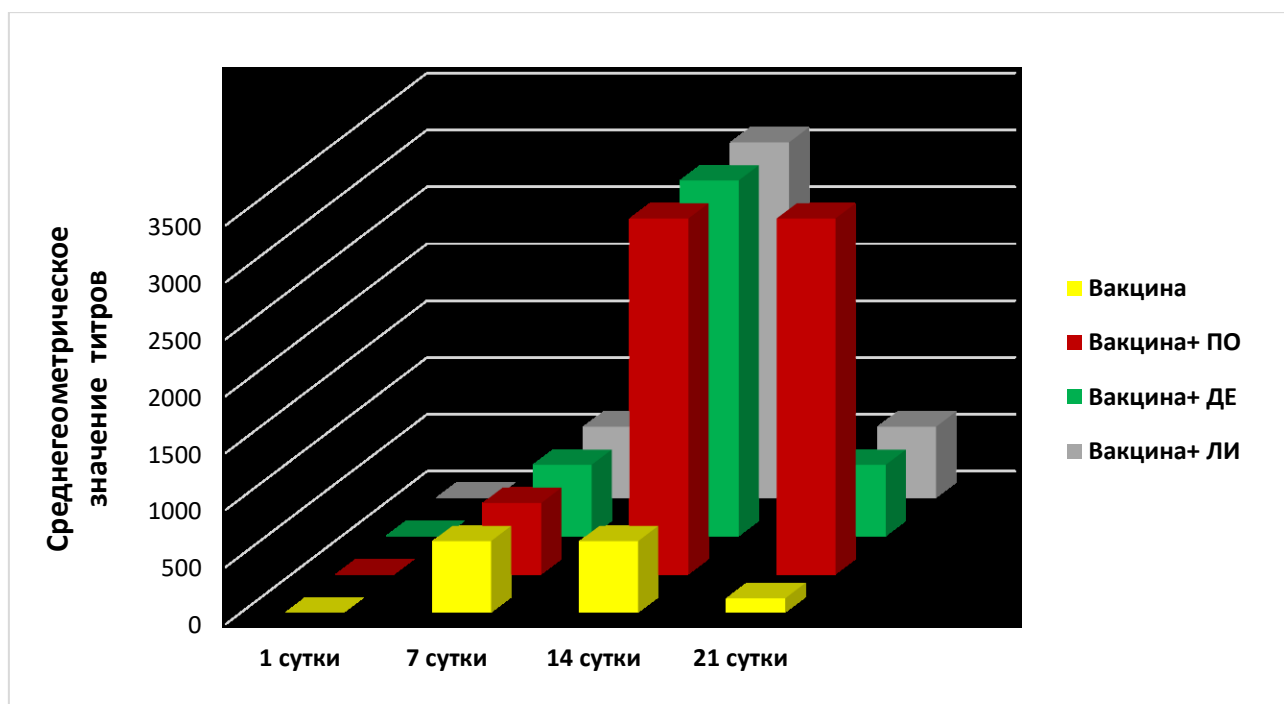
3.1.6 Влияние иммуномодуляторов на синтез противохолерных иммуноглобулинов в сыворотке крови вакцинированных взрослых кроликов

Учитывая, что холерная вакцина вызывает выработку специфических антител в организме привитых, было изучено влияние иммуномодуляторов на этот процесс у вакцинированных взрослых кроликов.

Как установлено, в первую неделю поствакцинального периода у всех взрослых кроликов опытных групп в сыворотке крови наблюдался одинаковый уровень продукции противохолерных антител (среднегеометрическое значение титра - 1:625) (рис. 11).

К 14 суткам количество специфических иммуноглобулинов у вакцинированных и получавших иммуномодуляторы кроликов становилось выше (среднегеометрическое значение титра - 1:3125), чем у только вакцинированных (среднегеометрическое значение титра - 1:625). К концу

третьей недели у группы вакцинированных животных отмечалось снижение антителопродукции в сыворотке крови (среднегеометрическое значение титра - 1:125). Также уменьшение синтеза противохолерных Ig наблюдалось у вакцинированных кроликов, получавших ДЕ и ЛИ (среднегеометрическое значение титра - 1:625). Только у животных, примированных ПО, титр специфических антител сохранялся на прежнем уровне (среднегеометрическое значение титра - 1:3125).



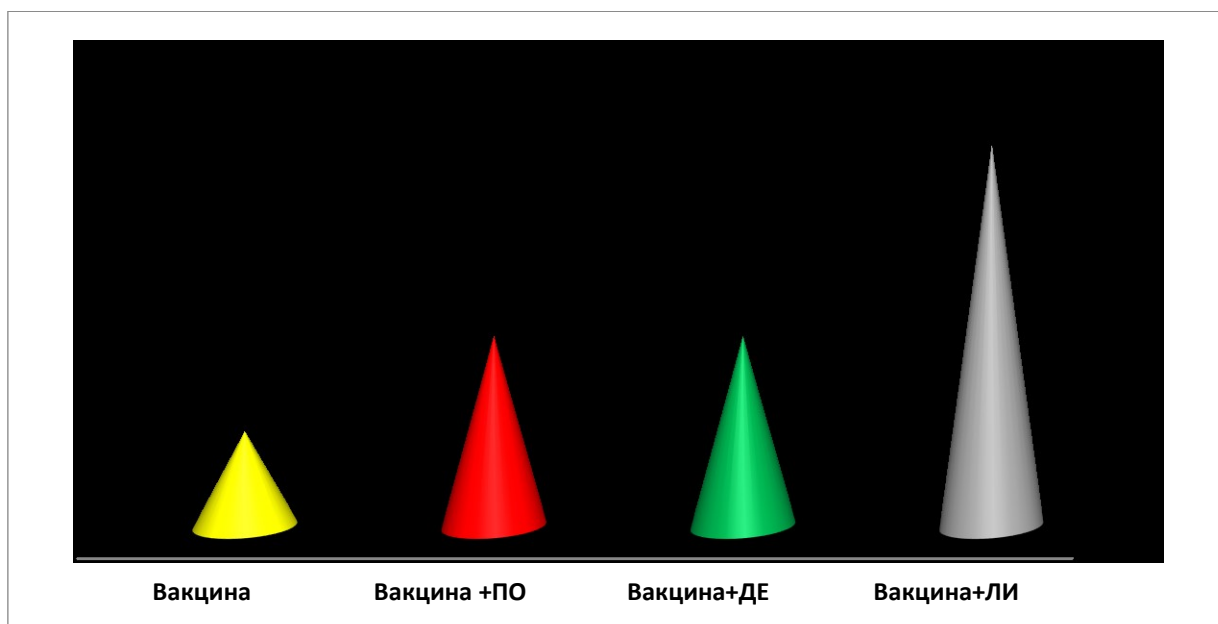
Примечание:

ПО - полиоксидоний, ЛИ – ликолипид, ДЕ – деринат; n=4 в каждой группе

Рисунок 11. Влияние иммуномодуляторов на синтез противохолерных иммуноглобулинов в сыворотке крови взрослых кроликов в первый месяц поствакцинального периода.

При исследовании длительности сохранения специфических иммуноглобулинов у вакцинированных животных выявлено, что через семь месяцев после начала эксперимента у группы иммунизированных животных титры противохолерных антител снизились до 1:64. У животных из групп, которые при вакцинации получали иммунопрепараты, также наблюдалось

снижение количества иммуноглобулинов, но среднегеометрические значения титров антител оставались выше, чем у вакцинированных кроликов: у получавших ДЕ - 1:128; ПО – 1:128. Наибольшее количество специфических антител сохранялось у животных, которым при вакцинации давали ЛИ – 1:256 (рис. 12).



Примечание:

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

Рисунок 12. Среднегеометрическое значение титра противохолерных иммуноглобулинов в сыворотке крови взрослых кроликов через семь месяцев после вакцинации.

Таким образом, сочетанное использование вакцины и иммуномодуляторов на начальных этапах формирования противохолерного иммунного ответа, приводит к увеличению продукции специфических иммуноглобулинов в сыворотке крови экспериментальных животных, особенно при использовании полиоксидония. Применение иммуномодуляторов при вакцинации, но в большей степени ЛИ, способствует сохранению более высокого титра противохолерных антител через семь месяцев после прививки.

3.2 Изучение влияния полиоксидония, ликопида, дерината на протективную активность вакцины холерной бивалентной химической таблетированной

3.2.1 Оценка действия полиоксидония, ликопида, дерината на протективность противохолерной вакцины на модели взрослых кроликов

Для оценки влияния иммуномодуляции на защитные свойства холерной вакцины использовали модель перевязанной петли тонкого кишечника взрослого кролика, которая позволяет получить у животных патогенетическую картину заболевания, сходную с таковой у человека [Burrows, 1974].

При оценке патологоанатомической картины в перевязанных петлях тонкого кишечника у интактных животных контрольной группы выявлены отек слизистой и подслизистой оболочек, кровоизлияния и некроз покровного эпителия ворсин, что свидетельствовало о наличии ярко выраженного энтеропатогенного эффекта. Опытные перевязанные петли тонкого кишечника контрольных животных были растянуты и заполнены полупрозрачным содержимым. Коэффициенты растяжения петель (К) у всех животных этой группы были больше единицы, что свидетельствовало о ярко выраженном холерогенном эффекте (табл. 8).

Результаты заражения вакцинированных животных через месяц после вакцинации продемонстрировали наличие достаточно напряженного поствакцинального иммунитета у 75 % кроликов - отсутствовали как холерогенный ($K=0,15\pm0,09$), так и энтеропатогенный эффекты. Только у 25% кроликов наблюдались признаки развития заболевания.

У всех групп вакцинированных животных, получавших иммуномодуляторы, при заражении через месяц не выявлено патоморфологических изменений в опытных петлях тонкого кишечника, что свидетельствовало о положительном влиянии иммунопрепаратов на

протективность вакцины химической таблетированной холерной бивалентной (табл. 8).

Таблица 8 - Влияние иммуномодуляторов на наличие/выраженность холерогенного и энтеропатогенного эффектов у взрослых кроликов через месяц после вакцинации ($M \pm SD$)

Группы животных:	Наличие/выраженность			
	холерогенного эффекта		энтеропатогенного эффекта	
	% животных	коэффициент растяжения петли (K)	% животных	степень проявления
контрольная (n=4)	100	1,14±0,06	100	сильная
вакцинированные (n=4)	25	1,1±0,08	0	отсутствует
вакцинированные + ПО (n=4)	0	0,15±0,09	0	отсутствует
вакцинированные + ДЕ (n=4)	0	0,14±0,07	0	отсутствует
вакцинированные + ЛИ (n=4)	0	0,12±0,06	0	отсутствует

Примечание: ПО - полиоксидоний, ЛИ – ликолипид, ДЕ – деринат. При $K > 1$ – наличие холерогенного эффекта

Через семь месяцев после вакцинации напряженность противохолерного иммунитета у группы вакцинированных кроликов уменьшилась (табл. 9). Протективный эффект вакцины был зарегистрирован только у 25 % животных ($K=0,19 \pm 0,04$). У 75% кроликов наблюдался холерогенный и слабовыраженный энтеропатогенный эффекты.

При оценке способности иммуномодуляторов повышать протективную активность холерной вакцины в отдаленные сроки (через семь месяцев) после вакцинации выявлено, что влияние ПО, ЛИ, ДЕ проявлялось в

разной степени. Признаков развития заболевания не было обнаружено у 75 % животных, получавших ЛИ ($K=0,16\pm0,04$), у 25% кроликов из этой группы развивался только холерогенный эффект. Патоморфологическая картина, характерная для холеры, наблюдалась у 50% животных из групп с ПО ($K=1,04\pm0,02$) и ДЕ ($K=1,06\pm0,04$), причем у вакцинированных кроликов, получавших ДЕ, присутствовал и слабовыраженный энтеропатогенный эффект.

Таблица 9 - Влияние иммуномодуляторов на наличие/выраженность холерогенного и энтеропатогенного эффектов у взрослых кроликов через семь месяцев после вакцинации ($M \pm SD$)

Группы животных:	Наличие/выраженность			
	холерогенного эффекта		энтеропатогенного эффекта	
	% животных	коэффициент растяжения петли (K)	% животных	степень проявления
контрольная (n=4)	100	$1,18\pm0,06$	100	сильная
вакцинированные (n=4)	75	$1,12\pm0,08$	75	слабая
вакцинированные + ПО (n=4)	50	$1,04\pm0,02$	0	отсутствует
вакцинированные + ДЕ (n=4)	50	$1,06\pm0,04$	50	слабая
вакцинированные + ЛИ (n=4)	25	$1,05\pm0,02$	0	отсутствует

Примечание: ПО - полиоксидоний, ЛИ – липид, ДЕ – деринат. При $K>1$ – наличие холерогенного эффекта

Результаты экспериментов по изучению возможности снижения рекомендуемой дозы противохолерной вакцины в два раза при ее сочетанном применении с иммуномодуляторами показали, что после заражения кроликов

признаки заболевания не развивались только у взятых в эксперимент животных, получавших ЛИ при вакцинации ($K=0,19\pm0,02$) (табл. 10). ДЕ и ПО препятствовали развитию холеры у 50 % вакцинированных сниженной дозой вакцины кроликов ($K=0,41\pm0,08$ и $K=0,22\pm0,04$, соответственно). У остальных животных этих групп наблюдались холерогенный и слабовыраженный энтеропатогенный эффекты (см. табл. 10).

Таблица 10 - 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	
	% животных	коэффициент растяжения петли (K)	% животных	степень проявления
контрольная (n=4)	100	$1,25\pm0,08$	100	сильная
вакцинированные (n=4)	100	$1,12\pm0,02$	100	средняя
вакцинированные + ПО (n=4)	50	$1,08\pm0,02$	50	слабая
вакцинированные + ДЕ (n=4)	50	$1,06\pm0,04$	50	слабая
вакцинированные + ЛИ (n=4)	0	$0,19\pm0,02$	0	отсутствует

Примечание: ПО - полиоксидоний, ЛИ – ликолипид, ДЕ – деринат. При $K>1$ – наличие холерогенного эффекта

Следует отметить, что у животных, вакцинированных сниженной в два раза дозой вакцины, наблюдалась патогенетическая картина, характерная для холеры: опытные перевязанные петли тонкого кишечника были растянуты и заполнены красноватым средней степени мутности содержимым

($K=1,12 \pm 0,02$), наличие отека и кровоизлияний свидетельствовали о развитии энтеропатогенного эффекта.

По окончании данного этапа исследования была проведена оценка наличия коррелятивной связи между уровнем продукции специфических иммуноглобулинов в сыворотке крови опытных животных и количеством кроликов, у которых в тонком кишечнике отсутствовали признаки развития экспериментальной холеры. После проведенного корреляционного анализа выявлено наличие между этими признаками прямой связи, сила которой по шкале Чеддока была нами определена как весьма высокая ($r=0,984$), что может быть использовано при создании способов, позволяющих контролировать и прогнозировать защитную эффективность противохолерной иммунизации.

Таким образом, сочетанное использование вакцины и иммуномодуляторов, особенно ликопада, приводит к увеличению защитной эффективности противохолерной вакцинации как в начальные, даже при использовании сниженной дозы вакцины, так и отдаленные сроки поствакцинального периода.

3.2.2 Оценка влияния полиоксидония, ликопада, дерината на протективную активность противохолерной вакцины на модели генерализованной формы холеры у мышей

Данная экспериментальная модель используется уже длительное время для определения иммуногенности вакцин и для оценки эффективности антибиотиков при холере.

При оценке протективности противохолерной вакцины выявлено, что вакцинация предотвратила гибель около 70% мышей, зараженных вирулентным штаммом холеры.

Введение ЛИ и ПО при иммунизации достоверно ($p < 0,05$) по сравнению с группой вакцинированных мышей повышает защитную эффективность противохолерной вакцины, увеличивая количество выживших

животных при генерализованной форме холеры (100 % и 90% мышей, соответственно) (табл. 11).

У животных из группы с ДЕ генерализованная холера не развивалась у 80 % мышей, что достоверно не отличалось от количества выживших вакцинированных животных ($p > 0,05$). Интактные мыши контрольной группы все погибли.

Таблица 11 - Оценка способности иммуномодуляторов повышать протективные свойства вакцины холерной бивалентной химической на модели генерализованной холерной инфекции у мышей ($M \pm SD$)

Группы животных	Количество зараженных животных	Количество выживших животных после заражения <i>V. cholerae</i> 01 569B	Протективность %
контрольные	30	0	-
вакцинированные	30	21 \pm 1,65	70 \pm 5,5*
вакцинированные + ПО	30	27 \pm 2,0	90 \pm 6,7* **
вакцинированные + ДЕ	30	24 \pm 1,23	80 \pm 4,1*
вакцинированные + ЛИ	30	30 \pm 0,00	100* **

Примечание:

ПО - полиоксидоний, ЛИ – ликоид, ДЕ – деринат.

* — достоверное отличие от группы интактных животных ($p < 0,05$)

** — достоверное отличие от группы вакцинированных животных ($p < 0,05$)

Следующим этапом исследования было выявление наличия коррелятивной зависимости количества выживших после заражения мышей от продукции sIgA в тонком кишечнике животных, а также эксперсии на поверхности лимфоцитов маркеров ранней и поздней активации.

Изучение корреляции между количеством sIgA и выживших после заражения вирулентным штаммом холеры животных выявило присутствие прямой связи с высокой силой ($r=0,800$).

При оценке возможности корреляции между протективностью поствакцинального иммунитета и количеством молекул активации на иммунокомпетентных клетках экспериментальных животных обнаружено наличие прямой связи, сила которой по шкале Чеддока была определена как высокая ($r=0,800$) между числом выживших животных и экспрессией CD69 и CD23, и умеренной прямой связи ($r=0,400$) с продукцией CD38 ($p<0,05$).

Эти результаты могут быть полезны для разработки методов контроля эффективности противохолерной вакцинации.

Таким образом, данные, представленные в данном разделе, свидетельствуют о том, что протективные свойства противохолерной вакцины стимулируют липопид и полиоксидоний, которые защищают от генерализованной холеры большинство взятых в эксперимент вакцинированных мышей.

ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Вакцины, созданные на основе инактивированных возбудителей, очищенных и рекомбинантных антигенов, обладают недостаточной иммуногенностью [Медуницын, Яковлева, 2012]. Вакцина холерная бивалентная химическая таблетированная – единственный зарегистрированный в России профилактический препарат против холеры – вызывает формирование гуморального иммунитета у привитых сроком до полугода [Онищенко и др., 2016]. Однако показано, что хотя антитела к обоим сероварам холерных вибрионов O1 серогруппы и выявляются у вакцинированных животных в течение шести месяцев поствакцинального периода, их защитная эффективность недостаточна для предотвращения развития экспериментальной холеры у большинства взрослых кроликов [Филиппенко и др., 2021].

Известно, что одним из подходов, способствующих формированию более устойчивого и продолжительного специфического иммунного ответа на инактивированные и субъединичные вакцины, является использование различных адъювантов. При выборе адъюванта в каждом конкретном случае необходимо учитывать физическую и химическую природу антигенов, входящих в состав вакцины, тип иммунного ответа на нее, способ введения вакцины, а также целевые группы вакцинируемых. Увеличению иммуногенной способности каждого конкретного профилактического препарата может способствовать применение адъювантов с определенными свойствами [Алпатова, 2020]. Следует также учитывать направленность его действия на формирование специфического иммунного ответа в зависимости от биологических особенностей возбудителя.

Иммунопрепараты, использование которых возможно в качестве адъювантов при противохолерной вакцинации, должны активировать как местный, так и системный гуморальный иммунный ответ. Нами были отобраны полиоксидоний, деринат, липоксид, относящиеся к разным классам

иммуномодуляторов, отличающиеся друг от друга по физико-химической природе и иммуностимулирующим свойствам, и оценена целесообразность и эффективность их сочетанного применения с противохолевой вакциной.

Характеристика поствакцинального иммунитета включает в себя разные методические приемы, основанные на оценке активации лимфоцитов, перераспределения популяций и субпопуляций этих клеток, поэтому мы исследовали количественный и качественный состав лимфоцитов у вакцинированных белых мышей и влияние иммуномодуляторов на этот процесс. У вакцинированных животных выявлено увеличение, по сравнению с интактными, относительного количества $CD3^+$ лимфоцитов селезенки и пейеровых бляшек. Статистически значимое по сравнению с контрольной группой животных увеличение процентного содержания В-лимфоцитов, наблюдалось к концу первой недели у вакцинированных мышей, как в селезенке, так и в ПБ. При изучении влияния 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. Также у мышей опытных групп, получавших при вакцинации иммуномодуляторы, но особенно полиоксидоний, на 7-21 день наблюдения было зарегистрировано значительное увеличение относительного числа $CD19^+$ лимфоцитов, как в селезенке, так и ПБ. В экспериментальных и клинических исследованиях при заболеваниях различной этиологии выявлено, что полиоксидоний, деринат, ликопид оказывают стимулирующее влияние на процессы пролиферации Т- и В-лимфоцитов. Так, полиоксидоний действует на клеточном уровне: с одной стороны, он стимулирует продукцию ИЛ-2 иммунокомпетентными клетками, с другой – экспрессию CD25, обеспечивая восстановление пролиферативной активности Т-лимфоцитов [Арипова и др., 2017]. Этот иммуномодулятор вызывал увеличение абсолютного содержания $CD3^+$ - и $CD4^+$ -лимфоцитов у

старых крыс [Дьяконова и др., 2004], а при сочетанном применении с *Y. pestis EV* НИИЭГ - увеличение пролиферации клеток в Т-зонах лимфоидных органов и активацию субпопуляций Т- и В-лимфоцитов у мышей линии BALB/c [Дьяконова и др., 2004; Бугоркова и др., 2017]. У пациентов с различными заболеваниями инфекционной и неинфекционной природы введение этого препарата в схему лечения способствовало повышению относительного содержания CD3⁺- и CD19⁺-лимфоцитов [Мухамадиева и др., 2009; Чеснокова и др., 2013], в том числе у пожилых [Парахонский, 2008] и детей раннего возраста [Кайтмазова, 2022]. Применение ликопида у пациентов способствовало увеличению общего уровня лимфоцитов, CD3⁺- и CD19⁺клеток, свидетельствуя об активации иммунной системы [Мановицкая и др., 2007]. Иммуномодулирующее действие дерината у пациентов проявлялось в увеличении числа и активности нейтрофилов, макрофагов, НК-клеток, а также количества Т- и В -лимфоцитов [Будяков, 2010; Громов, Пивоварова, 2012; Бражник и др., 2016].

Выявлено также, что повышение относительного числа Т-клеток обусловлено увеличением относительного содержания субпопуляции CD4⁺-лимфоцитов, которое наблюдается в селезенке, начиная с седьмых суток после вакцинации, и в ПБ с 14 суток после введения вакцины во всех опытных группах мышей, но в большей степени под влиянием полиоксидония. Такой эффект полиоксидония может быть связан с его способностью активировать дендритные клетки, которые в свою очередь стимулируют пролиферацию Т-хелперов под влиянием специфического антигена [Варфоломеева, 2011]. Другими авторами были показаны активирующие Т-хелперы эффекты дерината [Будяков, 2010; Громов, Пивоварова, 2012; Бражник и др., 2016; Чубарян и др., 2016;] и ликопида [Чувиров, Ярцев, 2000].

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

Активация лимфоцитов в процессе формирования поствакцинального иммунитета, наряду с субпопуляционными сдвигами, может выражаться в повышении или понижении ими продукции биологически активных регуляторов – цитокинов. Цитокины играют ключевую роль в регуляции врожденного и специфического иммунитета, особенно в процессах, связанных с пролиферацией и дифференцировкой Т- и В- лимфоцитов. Кроме деления популяции Т-клеток на Th и цитотоксические лимфоциты, субпопуляция CD4⁺лимфоцитов может быть разделена на подклассы по функциональной активности, которая связана с синтезируемыми цитокинами. Активация Th1, секретирующих ФНО-α, ИЛ-2 и ИФ-γ, ведет к стимуляции главным образом функций Т-лимфоцитов и макрофагов и развитию клеточного иммунного ответа, тогда как синтез Th2 таких цитокинов как ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-10 и ИЛ-13 стимулирует преимущественно гуморальное звено иммунитета. От внутриклеточных патогенов защищает клеточный иммунитет, формирование которого зависит от Th1, тогда как внеклеточные патогены нейтрализуются и выводятся из организма благодаря гуморальному иммунитету, поддерживаемому Th2 [Ройт и др., 2000; Симбирцев, Тотолян, 2015]. В связи с этим в процессе формирования противохолерного иммунитета был изучен цитокиновый профиль у вакцинированных животных и оценено влияние иммуномодуляции на этот процесс.

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. При изучении влияния иммуномодуляторов на цитокинпродуцирующую активность лимфоцитов вакцинированных мышей выявлено, что все иммунопрепараты стимулируют этот процесс уже с третьих суток поствакцинального периода. Именно неспособность лицензированных в настоящее время химических/инактивированных противохолерных вакцин вызывать воспалительные процессы на местном и системном уровне может

являются причиной их ограниченной эффективности [Naidu, S Lulu, 2022]. Эти вакцины не содержат живых бактерий, поэтому продолжительность и напряженность поствакцинального противохолерного иммунитета отличается от постинфекционного [Montero et al., 2023]. Известно, что перенесенная холера вызывает формирование напряженного иммунитета. При острой инфекции увеличивается продукция цитокинов таких как ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ИЛ-17 [Weil et al., 2019]. Обширный воспалительный ответ, индуцируемый в кишечнике вскоре после начала болезни, играет важную роль в развитии долгосрочного мукозального иммунитета против *V. cholerae* [Kuchta et al., 2011; Ellis et al., 2015].

Для оценки функционального состояния как отдельных популяций лимфоцитов, так и иммунной системы в целом может быть использовано изучение экспрессии поверхностных маркеров, характеризующих жизненный цикл клеток [Пашнина, 2014]. Противохолерная вакцинация индуцирует формирование иммунного ответа преимущественно по гуморальному типу, поэтому для оценки ее эффективности необходимо оценивать экспрессию рецепторов на мембране как Т-клеток, так и В-лимфоцитов. Мы остановили свой выбор на трех рецепторах: CD69⁺, CD38⁺, CD23⁺.

CD69⁺ - маркер ранней активации лимфоцитов, он появляется уже спустя несколько часов после антигенной стимуляции. Экспрессию молекулы CD69⁺ считают основным фенотипическим признаком наиболее ранней (первые часы) стадии активации наивных CD4⁺ лимфоцитов. Рецептор CD69⁺ действует как костимулирующая молекула Т-клеточной активации и пролиферации [Фирстова и др., 2010] и имеет важное значение для формирования и сохранения специфических Т-лимфоцитов памяти, влияющих на формирование поздней фазы гуморального иммунного ответа [Литвинова и др., 2014].

CD38⁺ – маркер плазматических клеток, его продукция регистрируется на ранних стадиях дифференцировки лимфоцитов. Затем экспрессия рецептора прекращается и вновь начинается уже на зрелых

лимфоцитах, находящихся на поздних стадиях активации, отражая степень активности клеточного звена иммунитета [Маризина и др., 2014]. CD38⁺ обеспечивает проводимость сигнала активации в Т-клетки и является регулятором в гуморальном ответе, так как участвует в В-клеточной активации [Литвинова и др., 2014; Абакушина и др., 2015]. В активированных лейкоцитах CD38⁺ формирует комплекс с другими поверхностными молекулами (CD19⁺ и рецепторами хемокинов), влияя на пролиферацию и миграцию клеток. Показано, что В-лимфоциты также экспрессируют CD38⁺ [Соловьева и др., 2013].

CD23⁺ - низкоаффинный рецептор для иммуноглобулина класса Е. Появляется после активации на поверхности В-лимфоцитов и является характерным антигеном активированных В-клеток. Также этот маркер служит показателем роста В-клеток и их выживаемости в зародышевых центрах.

Полученные результаты свидетельствуют о том, 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. Экспрессию CD69⁺, начиная с первых этапов исследования, усиливают все иммуномодуляторы, но особенно полиоксидоний и ликопид, их стимулирующее действие сохраняется до конца эксперимента. Такая же тенденция была выявлена нами при изучении влияния иммунопрепаратов на синтез CD23⁺: в наибольшей степени и более ранние сроки полиоксидоний и ликопид способствовали экспрессии этого маркера на мембранах иммунокомпетентных клеток белых мышей. Достоверное, по отношению к вакцинированным животным, увеличение числа CD38⁺ наблюдалось нами только под влиянием ПО, начиная с первой недели и до конца периода наблюдения.

Об интенсивности формирования гуморального иммунного ответа можно судить, оценивая продукцию специфических антител, а также

количество антигенспецифических антителообразующих клеток (АОК), синтезирующих иммуноглобулины. За одну секунду каждая АОК вырабатывает до нескольких тысяч молекул иммуноглобулинов, причем секретирует иммуноглобулины только одного изотипа (класса), аллотипа и идиотипа, то есть антитела к одному эпитопу [Быков, 2002]. Процесс превращения В-лимфоцита в АОК проходит несколько этапов, включая переключение изотипа иммуноглобулина, созревание аффинитета. При активации В-лимфоцитов в лимфоузле они поступают в зародышевый центр фолликула, где трансформируются в бласты — активно делящиеся клетки, и проходят процесс переключения изотипов Н-цепей иммуноглобулинов. После прекращения активного деления и перемещения в светлую зону фолликула, В-клетки проходят отрицательную селекцию на связывание мембранным иммуноглобулином антигена, который презентруется фолликулярной дендритной клеткой. После перехода в апикальную зону клетки снова делятся и дифференцируются в двух направлениях: В-клеток памяти и плазмобластов — предшественников плазматических клеток. Плазмобласты способны к делению и перемещению по крови в органы иммунной системы, где они оседают и окончательно дифференцируются в АОК [Ярилин, 2010].

При оценке действия иммуномодуляторов на количество антителообразующих клеток у белых 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 антигенспецифических антителообразующих клеток уже на первой неделе поствакцинального периода, по сравнению с вакцинированными мышами. Следует отметить, что под влиянием полиоксидония количество антителообразующих клеток оставалось выше до конца срока наблюдения, чем у животных, которым вводили деринат и ликолипид.

Наличие специфических антител является одним из важным факторов, позволяющим в полной мере охарактеризовать состояние иммунной системы в процессе формирования поствакцинального иммунного ответа. Проведена оценка антителопродукции в крови вакцинированных экспериментальных животных и влияния иммуномодуляторов на этот процесс. Выявлено, что в первую неделю поствакцинального периода у животных всех опытных групп в сыворотке крови наблюдался одинаковый уровень продукции противохолерных иммуноглобулинов (Ig). 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, примированных полиоксидонием, сохранялся титр специфических антител на прежнем уровне. Это явление обусловлено способностью полиоксидония *in vivo* стимулировать гуморальный иммунный ответ [Кривопапов, Щербань, 2017], усиливая продукцию специфических антител [Мухамадиева и др., 2009; Чеснокова и др., 2013; Кравцов и др., 2016], что позволяет получить в короткие сроки их более высокие титры [Ляпина и др., 2012].

Через семь месяцев после начала эксперимента у вакцинированных и получавших иммуномодуляторы животных также регистрировались более высокие, по сравнению с только вакцинированными животными, титры противохолерных антител, но особенно у кроликов из группы с ликолипидом. Такая способность ликопида может быть объяснена механизмом его взаимодействия с иммунной системой макроорганизма, в частности тем, что NOD2-рецептор, с которым связываются мурамилдипептиды, является адъювантным рецептором при продукции антител, а производные пептидогликана повышают Th2-иммунный ответ и продукцию IgG [Magalhaes et al., 2008; Ушкалова и др., 2019]. Показано также, что ликолипид

вызывает 2-5 кратное усиление антителообразования к корпускулярным и растворимым антигенам [Андропова, Пинегин, 2006; Пинегин, Пащенко, 2019].

При изучении влияния иммуномодуляторов на продукцию sIgA, основного эффектора слизистого иммунитета, в тонком 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 этого иммуноглобулина зарегистрировано у мышей, получавших полиоксидоний. Этот показатель в два раза превышал количество sIgA у вакцинированных животных. Деринат и ликолипид в полтора раза по сравнению с группой вакцинированных усиливали продукцию антител в тонком кишечнике белых мышей. Такая тенденция сохранялась до конца срока наблюдения.

Главная цель проведения любой вакцинации - формирование длительно сохраняющегося защитного иммунитета. Для оценки защитной эффективности противохолерной вакцинации при экспериментальной холере необходимо подобрать адекватные модели холерной инфекции на лабораторных животных, что вызывает некоторые трудности, поскольку истинной холерой болеют только люди. Инфекционный процесс при холере представляет собой последовательную цепь событий, включающую этап проникновения вибрионов в тонкий кишечник, адгезию их к энтероцитам, размножение микробов и колонизацию ими слизистой оболочки, выделение токсинов, в первую очередь, холерного токсина, ответственного за всю полноту клинической картины — диарею и дегидратацию. Только лишь при создании определенных условий, позволяющих преодолеть ряд естественных защитных барьеров и включающих способы снижения резистентности макроорганизма, можно вызвать холероподобное заболевание у экспериментальных животных, обладающих относительным видовым иммунитетом к холере и в естественных условиях холерой не болеющих.

Со времен исследований Р. Коха описано много систем моделирования экспериментальной холеры [Бардых, 1993], которые по результирующему инфекционному процессу делятся на две группы:

1. с развитием генерализованной инфекции после парентерального введения холерных вибрионов;
2. с развитием локализованной инфекции в тонком кишечнике после специального заражения [Burrows, Sack, 1974].

Каждая модель способна помочь в решении какой-то одной или нескольких конкретных задач морфо-, иммуно- или патогенеза холеры.

Модель перевязанной петли тонкого кишечника взрослого кролика, позволяет получить у животных патогенетическую картину заболевания, сходную с таковой у человека. Особенно важный фактор в патогенезе холеры человека – потеря жидкости и электролитов из тканей в просвет кишечника (холерогенный эффект) – почти полностью воспроизводится на этой модели, а сопутствующие гистологические изменения, такие, как отек более глуболежащих тканей, кровоизлияния и некрозы покровного эпителия ворсин (энтеропатогенный эффект) являются такими же, как и при заболевании у людей.

Модель генерализованной формы холеры у мышей используется достаточно давно [Pollitzer, 1959]. Она применяется для определения иммуногенности вакцин: имеются данные о корреляции между установленной на этой модели степенью иммуногенности и эффективностью холерной вакцины в полевых испытаниях на людях [Dragunsky et al., 1992], а также для оценки эффективности антибиотиков при холере [Либензон и др., 1974]: дальнейшие многолетние наблюдения за заболевшими доказали эффективность препаратов, отобранных на этой модели. Именно эти две экспериментальные модели были использованы для оценки протективности противохолерной вакцинации и степени влияния иммуномодуляторов на этот процесс.

Результаты заражения вакцинированных животных свидетельствовали о наличии достаточно напряженного поствакцинального иммунитета через месяц после прививки: у 75 % кроликов отсутствовали как холерогенный, так и энтеропатогенный эффекты. Только у 25 % животных регистрировалось наличие жидкости в опытных петлях кишечника, проявления энтеропатогенного эффекта отмечено не было. Через семь месяцев наблюдения протективный эффект вакцины регистрировался у 25 % животных. У 75% кроликов наблюдался холерогенный и слабо выраженный энтеропатогенный эффекты. У вакцинированных животных, получавших взятые в эксперимент 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. Это свидетельствовало о стимулирующем влиянии всех иммунопрепаратов на защитную эффективность противохолерной вакцины.

Оценка протективной способности холерной вакцины через месяц после прививки на другой экспериментальной модели показала, что после заражения вирулентными штаммами холеры выжили $70 \pm 5,5\%$ мышей. Влияние полиоксидония, ликопида, дерината на защитную эффективность вакцины бивалентной химической холерной продемонстрировала, что из всех препаратов наибольшей стимулирующей активностью обладал ликопид - выжили 100 % вакцинированных мышей. Из группы вакцинированных животных, получавших полиоксидоний, остались живы $90 \pm 6,7\%$ животных. У мышей из группы с деринатом генерализованная холера не развивалась у $80 \pm 4,1\%$ животных.

Полученные нами данные согласуются с мнением других исследователей о перспективности применения иммуномодуляторов для совершенствования специфической профилактики других особо опасных инфекций, в частности, чумы [Коготкова и др., 2004; Кравцов и др., 2016; Гончарова и др., 2020; Щуковская и др., 2020]

Через семь месяцев после вакцинации протективность холерной вакцины значительно снизилась: патоморфологических признаков развития холеры не было выявлено только у 25 % животных. Влияние полиоксидония, ликопида, дерината на протективную активность холерной вакцины в эти сроки проявлялось в разной степени. Признаки заболевания не регистрировались у 75 % животных из группы с ликопидом, у 25% кроликов из этой группы развивался только холерогенный эффект. 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.

Результаты экспериментов по изучению возможности снижения рекомендуемой дозы противохолерной вакцины привели к тому, что у всех вакцинированных животных развивался в тонком кишечнике как холерогенный, так и энтеропатогенный эффекты. При сочетанном применении иммуномодуляторов со сниженной дозой вакцины признаки развития заболевания не регистрировались только у взятых в эксперимент кроликов, получавших ликопид. Деринат и полиоксидоний препятствовали развитию холеры у 50 % вакцинированных сниженной дозой вакцины кроликов, что свидетельствовало о неэффективности использования дерината и полиоксидония в данном случае. Хотя, другими авторами показано, что за счет введения полиоксидония в схему иммунизации доза противочумной вакцины может быть снижена в пять раз без потери в уровне реактивности клеток иммунной системы и эффективности защиты организма от чумной инфекции [Кравцов и др., 2016].

Способность ликопида наиболее эффективно повышать защитную эффективность противохолерной вакцины в начальные и отдаленные сроки поствакцинального периода очевидно связана с тем, что мурамилдипептиды и глюкозаминилмурамилдипептид (ГМДП), к которым относится ликопид - это молекулы, представляющие собой природную модель

иммуностимулятора - фрагмент оболочки всех микробов. Эволюционно иммунная система подготовлена к встрече с такой молекулой - естественным адъювантом [Пинегин и др., 2005; Al Nabhani et al., 2017; Пинегин, Хаитов, 2019; Хаитов, 2020]. Пептидогликаны и мурамилдипептиды проникают через эпителий кишечника человека, осуществляя постоянную стимуляцию мукозальной иммунной системы. Липопептид вносит свой вклад в стимуляцию на уровне кишечника [Дегтярева, 2007], что является одним из важных факторов в осуществлении защиты от холеры. Механизм действия этого препарата имитирует естественный процесс обнаружения фрагментов пептидогликана микроорганизмов [Ушкалова и др., 2019]. ГМДП, который взаимодействует с NOD2-рецепторами врожденного иммунитета, влияет на мукозальный иммунитет, регулируя деятельность эпителиоцитов слизистых покровов на уровне местного и системного иммунитета, корректируя его гуморальное и клеточное звенья. Известно, что в организме человека и животных NOD-рецепторы выявляются во многих тканях и органах, в том числе и иммунной системы. Кроме того, NOD2-рецепторы присутствуют в эпителиальных клетках дыхательного, желудочно-кишечного и урогенитального тракта, а также в мышечных и эндотелиальных клетках, поэтому можно считать, что эти рецепторы в организме человека играют роль сенсора патогенов и инициатора врожденного иммунного ответа слизистых оболочек [Di Stefano et al., 2017]. Активация внутриклеточных NOD2-рецепторов приводит к увеличению синтеза иммуноглобулинов, хемокинов, интерферонов и других цитокинов [Гапонов и др., 2018]. Муцины и sIgA, присутствующие в слизистых оболочках, препятствуют адгезии патогенов на эпителиоцитах [Гурьянова, Хаитов, 2020]. Результаты изучения биологической активности ГМДП свидетельствуют о том, что он способен регулировать функции клеток врожденного и приобретенного иммунитета; способствовать правильному балансу Th1/Th2, обеспечивая адекватное функционирование иммунной системы, активировать все имеющиеся системы защиты от возбудителей [Гурьянова и др., 2009].

Обнаруженная нами прямая корреляционная связь между протективностью поствакцинального иммунитета, количеством молекул активации на иммунокомпетентных клетках, антилопродукцией в сыворотке крови и тонком кишечнике вакцинированных экспериментальных животных свидетельствует о возможности разработки методов, позволяющих контролировать и прогнозировать защитную эффективность противохолерной иммунизации.

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, особенно у животных из группы с ликопидом.

Показано, что 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 ликопидом, может являться одним из перспективных подходов к совершенствованию специфической профилактики холеры.

ВЫВОДЫ

1. Введение при вакцинации иммуномодуляторов, особенно полиоксидония и ликопида, 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 ликопид 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, ликопида 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, ликопида 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 ликопида, 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 ликопид 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 ликопида 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 ликопида, позволяет снизить рекомендуемую дозу противохолерной вакцины, что способствует уменьшению антигенной нагрузки на макроорганизм при сохранении защитной эффективности профилактического препарата.
9. Применение ликопида 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 ликолипид способствуют усилению иммуногенных и протективных свойств противохолерной вакцины в первый месяц поствакцинального периода, а также увеличению, особенно под влиянием ликопида, напряженности противохолерного иммунитета через семь месяцев после прививки, что свидетельствует о перспективности и целесообразности их использования для повышения эффективности специфической профилактики холеры.

Список сокращений

АДФ - аденозиндифосфат

АОК - антителообразующие клетки

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ГМДП - глюкозаминилмурамилдипептид

ДЕ – деринат

ДНК- дезоксирибонуклеиновая кислота

т-ДНК – участок T_i-плазмиды

ЗФР – забуференный физиологический раствор

ИЛ- интерлейкин

ИФА - иммуноферментный анализ

ИФ - интерферон

К - коэффициент растяжения петли

ЛИ – ликопид

ЛПС - липополисахарид

МКА - моноклональные антитела

ПБ - пейеровы бляшки

ПО - полиоксидоний

ФГА-М - фитогемагглютинин

ФНО- α – фактор некроза опухоли

CD – кластер дифференцировки

ctxA – ген холерного токсина

hlyA - ген гемолизина

Ig – иммуноглобулин

МНС – главный комплекс гистосовместимости

NOD - домен олигомеризации нуклеотидов

PAMP - патоген-ассоциированный молекулярный паттерн

RPMI – питательная среда для культуры клеток

sIgA - секреторный иммуноглобулин А

Th – Т-хелпер

Toll (TLR) – рецепторы врожденного иммунитета

α -GalCer - α -Галактозилцерамид

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абакушина Е.В. Особенности субпопуляционного состава лимфоцитов у онкологических больных при комбинированном лечении с адоптивной иммунотерапии / Е.В. Абакушина, Ю.В. Маризина, Г.С. Неприна и др. // Сибирский онкологический журнал. – 2015. - №1. – С.45-50.
2. Абрамова Н.Н. Влияние бестима и беталейкина на иммунный статус больных с вторичными иммунодефицитными состояниями при вакцинации против вирусного гепатита В / Н.Н. Абрамова, А.С. Симбирцев, И.И. Долгушин // Цитокины и воспаление. – 2004. – Т. 3, № 4. – С. 29 - 35.
3. Авдеева Ж.И. Влияние цитокинов на иммуногенные свойства вакцины против клещевого энцефалита / Ж.И. Авдеева, С.Е. Акользина, Н.А. Алпатова, Т.А. Никитина, М.Н. Ращепкина и др. // Цитокины и воспаление. – 2009. – Т. 8, № 2. – С. 25 - 29.
4. Алпатова Н.А. Иммуноадьювантное действие препаратов цитокинового ряда / Н.А. Алпатова, Т.Н. Никитина, Ж.И. Авдеева // Биопрепараты. – 2010. - № 3 (39). – С. 26 - 27.
5. Алпатова Н.А. Экспериментальное изучение роли цитокинов с целью повышения иммуногенной активности антирабических вакцин / Н.А. Алпатова, Ж.И. Авдеева, А.А Мовсесянц, Н.В. Медуницын // Иммунология. – 2018. – Т.39, № 2-3. – С.143-151.
6. Алпатова Н.А. Иммунный ответ при иммунизации противовирусными вакцинами / Н.А. Алпатова, Ж.И. Авдеева, Л.А. Гайдерова, С.Л. Лысикова, Н.В. Медуницын // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2020. - 20(1). – С. 21–29.
7. Алпатова Н.А. Общая характеристика адьювантов и механизм их действия (часть 1) / Н.А. Алпатова, Ж.И. Авдеева, С.Л. Лысикова, О.В. Головинская, Л.А. Гайдерова // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2020. - № 20 (4). – С. 245–256.

8. Андропова Т., Пинегин Б. Мурамилдипептиды – иммуотропные лекарственные средства нового поколения //Венерологг. - 2006. - №6. - С.11–15.
9. Арипова Т.У. Иммуномодулирующее действие полиоксидония у часто болеющих детей / Т.У. Арипова, Д.А. Мусаходжаева, Н.Н. Шоазизов, Д.Н. Джумаева // Медицинская иммунология. – 2017. - Т. 19. - Специальный выпуск. - С.237.
10. Афиногенова В.П. Иммунотерапия: механизм действия и клиническое применение иммунокорректирующих препаратов / В.П. Афиногенова, И.В. Лукачёв, М.П. Костинов // Лечащий врач. – 2010. - № 4. – С. 1 – 5.
11. Бардых И.Д. Экспериментальные модели в патогенезе холеры: Автореф. дис...канд. мед. наук. - 1993. – 18 с.
12. Баринский И.Ф. Изучение эффективности использования отечественных иммуномодуляторов, а также их сочетанного действия со специфическими вакцинами при экспериментальных арбовирусных инфекциях / И.Ф. Баринский, А.А. Лазаренко, Л.М. Алимбарова // Иммунология. - 2012. - №4. - С. 181-183.
13. Баринский И.Ф. Иммуномодуляторы и специфические инактивированные вакцины в экстренной профилактике экспериментальных арбовирусных инфекций / И.Ф. Баринский, Л.М. Алибарова, А.А. Лазаренко, А.А. Давыдова // Вопросы вирусологии. - 2013. – Т. 58, №4. – С. 35.
14. Баринский И.Ф. Вакцины как средство специфической иммунокоррекции при герпетических инфекциях / И.Ф. Баринский, Л.М. Алимбарова, А.А. Лазаренко и др. // Вопросы вирусологии. – 2014. – Т. 59. – С. 5-10.
15. Баринский И.Ф. Иммуномодуляторы и специфические инактивированные вакцины как средство экстренной профилактики острых вирусных инфекций и профилактики рецидивов хронических вирусных заболеваний / И.Ф. Баринский, Л.М. Алимбарова, А.А. Лазаренко, Махмудов

Ф.Р., Мордвинцева Э.Ю., Сергеев О.В. // Иммунология. – 2015. - №36(2). - С.95-98.

16. Богачева Н.В. Экспериментальное изучение влияния иммуномодуляторов на эффективность применения вакцины бруцеллезной живой сухой. / Н.В. Богачева, В.Ю. Охапкина, Н.В. Пяткова, А.К. Федотов, А.С. Кучеренко // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2016. - №2(87). - С.84-91.

17. Бражник Е.А. Деринат в комплексном лечении деструктивных форм рожистого воспаления / Е.А. Бражник, А.П. Остроушко, А.В. Бражник // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. – 2016. – Т.9. - № 4. – С.281-288.

18. Бугоркова С.А. Морфофункциональная характеристика иммунокомпетентных органов мышей линии BALB\С при иммунизации вакцинным штаммом *Yersinia pestis* EV НИИЭГ на фоне иммуномодуляции // С.А. Бугоркова, А.Ф. Курылина, Т.Н. Щуковская // Пробл. особо опасных инф. – 2017. - № 2. – Р.58-62.

19. Будяков С.В. Иммунокорригирующая эффективность Дерината при верхнечелюстном синусите // Научные ведомости. Серия Медицина. Фармация. - 2010. - № 22 (93). - Выпуск 12. - С. 130-136.

20. Быков В.Л. Цитология и общая гистология. Функциональная морфология клеток и тканей человека // Учеб. для ст. мед. инст., Сотис, С-Пб. – 2002. – 237с.

21. Варфоломеева М.И. Обоснование назначения и применение полиоксидония в лечении и профилактике ОРВИ / М.И. Варфоломеева, Б.В. Пинегин // Трудный пациент. – 2011. - Т. 9. - № 6. - С. 38-42.

22. Войткова В.В. Оценка иммуномодулирующих свойств субклеточных фракций чумного микроба в сочетании с адъювантами / В.В. Войткова, В.И. Дубровина, С.А. Витязева, В.С. Половинкина, Е.Ю. Марков, С.В. Балахонов // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2014. - № 4 (77). – С.83-88.

23. Волков А.А. Изучение иммуногенных свойств вакцины против сибирской язвы животных из штамма 55-внииввим в сочетании с иммуномодулятором «Иммунофарм» / А.А. Волков, В.Н. Ласкавый, А.А. Султанов, С.А. Староверов, Ю. М. Горелов, А.А. Абуталип // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 2-2.
24. Гапонов А.М. Влияние производного мурамилдипептида (ГМДП-А) на линии опухолевых клеток, экспрессирующих NOD-2 / А.М. Гапонов, Е.В. Якушенко, А.В. Тутельян, И.Г. Козлов // Российский иммунологический журнал. – 2018. – Т.12 (21). - № 2. – С.128–140.
25. Гончарова А.Ю. Экспериментальная оценка эффективности применения вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ в сочетании с иммуномодуляторами / А.Ю. Гончарова, С.А. Бугоркова, О.М. Кудрявцева, В.А. Кожевников, А.Л. Кравцов, и др. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2020. - № (2). – С.71-77.
26. Горбунов М.А. Характеристика комбинированной вакцины против гепатитов А и В с полиоксидонием (Гепол А+В) по результатам клинических испытаний / М.А. Горбунов, Г.А. Ельшина, Г.М. Игнатьев и др. // Биопрепараты. - 2010. - № 3 (39). – С. 14 - 15.
27. Горяев А.А. Эффективность и безопасность вакцин для профилактики холеры / А.А. Горяев, Л.В. Саяпина, Ю.И. Обухов, В.П. Бондарев // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2018. - № 18(1). – С.42-49.
28. Громов М.И. Применение иммуномодулятора Деринат в лечении хирургических больных с тяжелым сепсисом / М.И. Громов, Л.П. Пивоварова // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 7-2. – С. 289-295.
29. Гуляев С.А. Изучение иммуногенности прототипного вакцинного препарата против гепатита Е / С.А. Гуляев, А.А. Ляшенко, А.М. Чумаков, А.А. Сорокин, И.В. Гордейчук, и др. // Журн. микробиол. – 2017. - № 3. - С. 35—43.

30. Гурьянова С.В. Влияние глюкозаминилмурамилдипептида (ГМДП) на продукцию цитокинов мононуклеарными клетками у больных атопической бронхиальной астмой *in vitro* / С.В. Гурьянова, И.Г. Козлов, Е.А. Мещерякова, Т.М. Андропова // Российский аллергологический журнал. – 2009. - 3:236.
31. Гурьянова С.В., Хаитов РМ. Глюкозаминилмурамилдипептид - ГМДП: воздействие на мукозальный иммунитет (к вопросу иммунотерапии и иммунопрофилактики) // Иммунология. – 2020. - № 41 (2). – С.174-183.
32. Дегтярева М.В. Итоги 10-летнего опыта применения иммуномодулятора ликопида в неонатологии // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2007. - № 6. - С.83-88.
33. Демьянова О.Б. Стимуляция иммуногенных и протективных свойств антигенов возбудителя мелиоидоза цитокинами. Автореф. дис. канд. мед. наук. -2009. - 18 с.
34. Демьянова О.Б. Иммуностимулирующая активность синтетического дипептида бестима при мелиоидозной инфекции / О.Б. Демьянова, С.Б. Жукова, И.В. Авророва и др. // Матер. X съезда ВНПОЭМП. Москва. - 2012. - Т. 2, № 1, 2. - С. 99-100.
35. Демьянова О.Б. Использование цитокинов и синтетических пептидов для повышения иммуногенности мелиоидозных антигенов / О.Б. Демьянова, С.И. Жукова, А.А. Занкович, Н.П. Храпова, К.А. Ротов и др. // Проблемы особо опасных инфекций. - 2014. - № 3. – С. 83 - 85.
36. Дубровина В.И. Структурная перестройка органов белых мышей, вакцинированных *Yersinia pestis* EV в сочетании с селенорганическим соединением 974zh / В.И. Дубровина, Т.П. Старовойтова, О.В. Юрьева, С.А. Витязева, А.Б. Пятидесятникова, Т.А. Иванова, К.М. Кобытов, Г.Б. Мухтургин, С.В. Балахонов // Acta biomedica scientifica. – 2022. - №7(3). – С.110-120.
37. Дьяконова В.А. Изучение клеточных и молекулярных механизмов взаимодействия иммуномодулятора полиоксидония с клетками иммунной

системы человека / В.А. Дьяконова, В.В. Бураков, Г.В. Шаронов, Б.В. Пинегин // Иммунология. – 2004. - №3. – С.145-152.

38. Егорова Е.А. Разработка синтетической пептидной вакцины против гепатита С / Е.А. Егорова, Е.Ф. Колесанова, М.В. Мельникова, А.В. Таланова, О.М. Ипатова // Медицинская Иммунология. – 2015. - Т.17. - С. 261.

39. Еремин С.А. Технология производства новой холерной химической вакцины с использованием атоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* / С.А. Еремин, Т.Н. Щуковская, А.В. Комиссаров и др. // Холера и патоген. для человека вибрионы: Матер. совещ. специал. Роспотребнадзора по вопр. совершенствования эпид. надзора за холерой (5-6 июня 2013 г.). - Ростов-на-Дону. - 2013. - Вып. 26. - С. 232-235.

40. Жемчугов В.И. Использование метаболических иммунокорректоров для стимуляции иммунитета при некоторых особо опасных инфекциях / В.И. Жемчугов, С.И. Жукова, И.А. Дятлов, О.А. Волох, В.В. Кутырев и др. // Вестник ВолГМУ. – 2004. - № 12. – С. 29-31.

41. Жукова С.И. Стимуляция иммунного ответа к мелиоидозу препаратами рекомбинантных цитокинов / С.И. Жукова, И.В. Авророва, О.Б. Демьянова, Н.В. Храпова, К.А. Ротов, и др. // Цитокины и воспаление. - 2009. - №1. – С.32-35.

42. Жукова С.И. Использование цитокинов для усиления иммуногенных и иммуностропных свойств антигенов *Burkholderia pseudomallei* / С.И. Жукова, О.Б. Демьянова, В.В. Алексеев, И.В. Авророва, Н.П. Храпова, и др. // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2011. - № 1. – Р.43348.

43. Жукова С.И., Демьянова О.Б., Авророва И.В., Занкович А. А., Алексеев В.В., Храпова Н.П., Ротов К.А., Снатенков Е.А., Тихонов С.Н., Ломова Л.В. Способ повышения иммуногенности антигенов *B. pseudomallei* при экспериментальном мелиоидозе. 2013. Патент RU2483752C1

44. Иванова И.А. Современное состояние вопроса и перспективы развития неспецифической профилактики холеры / И.А. Иванова, Н.Р. Телесманич,

В.Д. Кругликов, Ю.М. Ломов // Здоровье нации и среда обитания - 2012. - № 4. - С. 15-17.

45. Иванова И.А. Изучение роли апоптоза лимфоцитов, индуцированного антигенами *Vibrio cholerae*, в формировании вторичного иммунодефицита и возможности его коррекции / И.А. Иванова, Н.Д. Омельченко, Н.Р. Телесманич, Г.И. Васильева, Е.П. Дорошенко и др. // Мед. вестник Юга России. - 2013. - №1. - С. 24-27.

46. Кайтмазова Н.К. Динамика показателей иммунитета у детей с обструктивным бронхитом / Н.К. Кайтмазова // Современные вопросы биомедицины. – 2022. – Т. 6. – № 1.

47. Каральник Б.В. Влияние иммуномодуляции на иммуногенную и протективную активность живой чумной вакцины / Б.В. Каральник, Т.С. Пономарева, П.Н. Дерябин, Т.Г. Денисова, Н.Н. Мельникова и др. // Журн. микробиол. – 2014. - № 6. – С. 108 - 112.

48. Караулов А.В. Иммуномодуляторы в профилактике и лечении респираторных инфекций у детей // Фарматека. – 2012. - № 1. – С. 10 - 13.

49. Караулов А.В. Обзор исследований вакцин семейства Гриппол и развития современных адъювантов / А.В. Караулов, А.С. Быков, Н.В. Волкова // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2019. - №18(4). – С.101-119.

50. Ключева С.Н., Щуковская Т.Н. Влияние адъювантов нового поколения *in vitro* на продукцию цитокинов клетками крови вакцинированных против чумы лиц / С.Н. Ключева, Т.Н. Щуковская // Российский иммунологический журнал. – 2015. - № 9(18). – Р.201-208.

51. Ключева С.Н. Фагоцитарная и цитокин-продуцирующая активность лейкоцитов крови мышей линии BALB\С, привитых против чумы на фоне иммуномодуляции полиоксидонием / С.Н. Ключева, А.Л. Кравцов, С.А. Бугоркова, Т.Н. Щуковская, В.А. Кожевников, А.Ю. Гончарова // Российский иммунологический журнал. – 2019. - № 13(4). – Р.1412–20.

52. Ключева С.Н. Влияние иммуномодуляции на внутриклеточную экспрессию цитокинов Т-хелперами селезёнки мышей, иммунизированных *Yersinia pestis* EV НИИЭГ/ Ключева С.Н., Гончарова А.Ю., Кравцов А.Л., Бугоркова С.А.// Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2021. - № 98(2). – С.156-162.
53. Коготкова О.И. Сочетанное применение в эксперименте сибиреязвенной вакцины СТИ-ПР с липопидом / О.И. Коготкова, Л.Ю. Аксёнова, Н.П. Буравцева, Е.И. Ерёменко // Мед. микробиол. – XXI век: Матер. Всерос. науч.- практич. конф., Саратов, 2004. – С. 119-120.
54. Кравцов А.Л. Влияние иммуномодуляторов на реактивность клеток иммунной системы при моделировании противотуляремийного вакцинного процесса / А.Л. Кравцов, С.Н. Ключева, С.А. Бугоркова // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2016. – Т. 15, № 3. – С. 94- 100.
55. Кравцов А.Л. Модулирующий эффект полиоксидония на реактивность клеток иммунной системы при формировании противочумного иммунитета / А.Л. Кравцов, А.Ф. Курылина, С.Н. Ключева, Т.Н. Щуковская // Иммунология. – 2016. -№ 37(6). – Р.320-325.
56. Кравцов А.Л. Эффект иммуномодуляторов и противотуляремийной вакцинации на апоптоз и лизис спленоцитов, взаимодействующих *in vitro* с тулярином / А.Л. Кравцов, С.Н. Ключева, Т.Н. Щуковская, С.А. Бугоркова // Пробл. особо опасных инф. – 2017. - № 3. – С.90-94.
57. Кривопапов А.А. Роль современных иммуномодуляторов лечения и профилактике заболеваний верхних дыхательных путей и уха / А.А. Кривопапов, К.Ю. Щербань // Медицинский Совет. – 2017. - № 16. – С. 68-72.
58. Курашова С.С. Адъюванты на основе углеводов для производства вакцин / С.С. Курашова, Т.К. Дзагурова, А.А. Ишмухаметов, М.С. Егорова, М.В. Баловнева и др. // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2018. - № 18 (2). – С. 81–91.

59. Либензон А.Е. Рифампицин в экстренной профилактике и терапии экспериментальной холерной инфекции, вызванной чувствительными и устойчивыми к антибиотикам вибрионами Эль-тор / А.Е. Либензон, А.М. Гольдерг, М.И. Богданова // Вопр. противоэпидем. защиты. – М. -1974.- Вып.24. – С. 214-220.
60. Литвинова Л.С. Основные поверхностные маркеры функциональной активности т-лимфоцитов / Л.С. Литвинова, А.А. Гуцол, Н.А. Сохоневич, К.А. Кофанова, О.Г. Хазиахматова, и др. // Медицинская иммунология. – 2014. -Т. 16, № 1. – С.7-26.
61. Лусс Л.В. Место иммуномодуляторов в педиатрической практике. Consilium medicum // Прил. Педиатрия. – 2010. - № 3. - С. 72 - 76.
62. Лусс Л.В. Полиоксидоний® – современный препарат для эффективной иммунотропной терапии заболеваний, протекающих с дисфункциями иммунной системы // Эффективная фармакотерапия. – 2015. - № 20. – С.16-22.
63. Ляпина А.М. Применение полиоксидония для получения специфических антител к бактериальным антигенам / А.М. Ляпина, Т.И. Полянина, О.В. Ульянова Ю.Ю. Елисеев, М.В. Телепнев и др. // Современные проблемы науки и образования. – 2012. - №2.
64. Мановицкая А.В. Использование иммуномодуляторов полиоксидония и ликопида у больных эндогенным гиперкортицизмом при наличии клиники вторичного иммунодефицита / А.В. Мановицкая, Е.И. Марова, А.Е. Шульженко // Русский медицинский журнал. – 2007. - № 11. – С.905.
65. Маризина Ю.В. Фенотип лимфоцитов у больных меланомой после иммунотерапии / Ю.В. Маризина, Г.С. Неприна, Д.В. Кудрявцев и др. // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. - Т. 13. - № 1. – С.57–144.
66. Маркова Т.П. Форсификация поствакцинального иммунитета у длительно и часто болеющих детей / Т.П. Маркова, М.Е. Харьянова //Аллергия, астма и клиническая иммунология. – 2001. - №1. – С. 21-25.

67. Маркова Т.П. Клинико-иммунологическое обследование и отбор пациентов с дисфункциями иммунной системы для проведения форсифицированной вакцинации, определения уровня специфических антител / Т.П. Маркова, Д.Г. Чувиров // Аллергия, астма и клиническая иммунология. – 2003. – №9. – С. 84-86.
68. Маркова Т.П. Мурамилпептиды: механизмы действия, клиническая эффективность и перспективы применения в медицине / Т.П. Маркова, Д.Г. Чувиров, Л.Г. Ярилина, Е.В. Кожина // РМЖ. Медицинское обозрение. – 2020. - № 4(1). – С.31-37.
69. Мац А.Н. Нарушения иммунологической памяти на АКДС-вакцинацию вследствие перинатального ВИЧ-контакта и антиретровирусной химиопрофилактики. Коррекция аффинолейкином / А.Н. Мац, М.Н. Кузьмина, В.В. Свиридов, А.М. Николаева // Биопрепараты. – 2010. - № 3 (39). – С. 23 - 24.
70. Медуницын Н.В. История, принципы конструирования комбинированных вакцин и проблемы вакцинопрофилактики при их применении // Журн. микробиол. - 2001. - №1. - С. 90-91.
71. Медуницын Н.В. Коррекция развития иммунитета при вакцинации // Био Препараты. - 2010. - №3. – С.18-24.
72. Медуницын Н.В. Совершенствование подходов к вакцинопрофилактике / Н.В. Медуницын, Т.В. Яковлева // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2012. – Т.3, №64. – С.70 – 8.
73. Медуницын Н.В. Проблемы коррекции иммунитета при вакцинации. // Иммунология. – 2017. - № 38 (3). – С. 148-154.
74. МУ 3.3.1.2075-06. 3.3.1. Вакцинопрофилактика. Основные требования к вакцинным штаммам холерного вибриона / Методические указания // Москва. – 2006. – 66 с.
75. Мухамадиева Л.Р. Клинико-иммунологическая эффективность имунофана и полиоксидония в комплексной терапии внебольничной пневмонии / Л.Р. Мухамадиева, Г.А. Мавзютова, Р.М. Фазлыева, Н.Р.

Бикметова // Медицинская иммунология. – 2009. № 11(1). С. - 57-62.

76. Нечаева Е.А. Разработка живой коревой вакцины с повышенной иммуногенностью / Е.А. Нечаева, Т.Ю. Сенькина, Н.В. Жилина, Ю.С. Нечаев, Н.Б. Думченко и др. // Медицинское обозрение. Наука и практика. – 2017. - №2(2). - С. 53-56.

77. Никитюк А.Ф. Организация иммунопрофилактики лиц с нарушениями в состоянии здоровья // Никитюк А.Ф., Глущенко В.А., Панин И.В. // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. - 2016. –Т.16, №1. С.35-42.

78. Никифорова А.Н. Результаты изучения безопасности и иммуногенности отечественной субъединичной адьювантной вакцины Совигрипп у добровольцев 18-60 лет. / А.Н. Никифорова, И.Н. Исакова-Сивак, М.К. Ерофеева, И.В. Фельдблюм, Л.Г. Руденко // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2014. - №2 (75). – С.72-78.

79. Омельченко Н.Д. Изучение иммуногенных свойств наружных мембран холерного вибриона / Н.Д. Омельченко, Б.Н. Мишанькин, И.А. Иванова, О.В. Дуванова, Л.В. Романова, и др. // Медицинская иммунология. – 2015. – Т.17. - №3. – С.120-121.

80. Онищенко Г.Г. Специфическая профилактика холеры в современных условиях / Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырев, Т.Н. Щуковская, Н.И. Смирнова, А.К. Никифоров и др. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2011. – Вып. 107. - С. 5-12.

81. Онищенко Г.Г. Актуальные проблемы эпидемиологического надзора, лабораторной диагностики и профилактики холеры в Российской Федерации / Г.Г. Онищенко, А.Ю. Попова, В.В. Кутырев, Н.И. Смирнова, С.А. Щербакова др. // Журн. микробиол. – 2016. - № 1. – С. 89-101.

82. Парахонский А.П. Клинико-иммунологическая характеристика иммунной недостаточности у пожилых людей и её коррекция // Современные наукоемкие технологии. – 2008. – № 7. – С. 89-90.

83. Пашнина И.В. Уровень спонтанной и стимулированной фитогемагглютинином экспрессии CD69 на Т-лимфоцитах у детей с аутоиммунными заболеваниями // Российский иммунологический журнал. – 2014. - Т. 8 (17). - №2(1). – С.126-128.
84. Петров Р.В., Хаитов Р.М., Некрасов А.В., Берестецкая Т.З., Наумов А.В., Горькова А.В., Джапаридзе М.Н., Щуковская Т.Н. Способ получения вакцины против холеры. Патент Российской Федерации № 2021816. <http://ru-patent.info/20/20-24/2021816.html>
85. Петров, Р.В. Способ получения вакцины против холеры / Р.В. Петров, Р.М. Хаитов, А.В. Некрасов и др. // Патент Российской Федерации № 2021817. <http://ru-patent.info/20/20-24/2021817.html>
86. Петров Р.В., Хаитов Р.М. Иммуногены и вакцины нового поколения: руководство. ГЭОТАР-Медиа; 2011. –608 с.
87. Пикуза О. И. Особенности местного иммунитета при острых бронхитах и пневмониях у детей и методы их коррекции / О.И. Пикуза, Л.Ф. Галимова, Е.А. Самороднова, Е.В. Агафонова // Практическая медицина. — 2010. — № 6 (45) — С. 133—136.
88. Пименов Е.В. Создание вакцин против сибирской язвы / Е.В. Пименов, В.В. Кожухов, Ю.И. Строчков // Природа. – 2000. - № 10. – С.12 - 19.
89. Пинегин Б.В. Иммунодефицитные состояния: возможности применения иммуномодуляторов / Б.В. Пинегин, Т.В. Латышева //Лечащий врач. – 2001. - № 3. – С. 101 – 106
90. Пинегин Б.В. Иммуномодулятор Полиоксидоний: механизмы действия и аспекты клинического применения / Б.В. Пинегин, А.В. Некрасов, Р.М. Хаитов // Цитокины и воспаление. – 2004. - № 3(3). - С.41–7.
91. Пинегин Б.В., Андропова Т.М., Карсонова М.И. Препараты мурамилпептидного ряда - иммуностропные лекарственные средства нового поколения. Ликопид в комплексном лечении и профилактике иммунодефицитных состояний. М. – 2005. – С.19-36.

92. Пинегин Б.В., Пашенков М.В. Иммуностимуляторы мурамилпептидной природы в лечении и профилактике инфекционно-воспалительных процессов. Иммунология. – 2019. - 40 (3). – С. 65-71.
93. Пинегин Б.В., Хаитов Р.М. Современные принципы создания иммуотропных лекарственных препаратов. Иммунология. – 2019. – № 40 (6). – С.57-62.
94. Пономарева Т.С. Влияние беталейкина на показатели антигенспецифического иммунного ответа в модельных опытах иммунизации животных живой противочумной вакциной / Т.С. Пономарева, П.Н. Дерябин, Б.В. Каральник, Т.Г. Денисова, Т.И. Тугамбаев и др. // Цитокины и воспаление. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 57 - 62.
95. Пономарева Т.С. Влияние полиоксидония на иммуногенную и протективную активность живой чумной вакцины / Т.С. Пономарева, П.Н. Дерябин, Б.В. Каральник, Т.И. Тугамбаев, Б.Б. Атшабар, и др. // Иммунология. – 2014. - № 35(5). – Р.286–90.
96. Протасов А.Д. Сочетанное применение вакцинации и иммунопрепарата в достижении длительной клинической ремиссии хронической ВПЧ-инфекции, проявляющейся остроконечными кондиломами аногенитальной области / А.Д. Протасов, Ю.В. Тезиков, М.П. Костинов, И.С. Липатов, О.О. Магаршак, А.А. Рыжов // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2016. – Т. 15, № 3. – С. 60- 66.
97. Пяткова Н.В. Комплексная терапия экспериментального мелиоидоза у золотистых хомячков препаратами фторхинолонов и иммуномодуляторов // Диагн., лечение и проф. опасных и особо опасных инфекционных заболеваний. Матер. Всеросс. науч. конф. – Киров. - 2008. - С. 110-111.
98. Ройт А. Иммунология / А. Ройт, Дж. Бростофф, Д.М. Мейл // Москва: Мир. - 2000. - 582 с.
99. Романенко В.В. Результаты клинического исследования по оценке безопасности и эффективности полимер-субъединичной адъювантной гриппозной вакцины при сочетанном применении иммуномодулятора у лиц

- 60 лет и старше / В.В. Романенко, И.В. Осипова, Д.А. Лиознов, С.Ю. Марцевич, А.В. Анкудинова, Т.В. Чебыкина // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2016. - №15(5). – С. 63-71.
100. Рубаник Л.В. Механизмы противохламидийного иммунитета и конструирование противохламидийной вакцины // Медицинские новости. – 2006. - № 11. – С. 29 – 35.
101. Серебряная Н. Б., Корнева Е. А. (ред.). Отечественные препараты из природной ДНК Деринат, Ферровир. Научная информация для специалистов и практических врачей. — Тверь: Издательство Триада, 2009. — 48 с.
102. Симбирцев А.С. Новые возможности применения рекомбинантных цитокинов в качестве адъювантов при вакцинации / А.С. Симбирцев, А.В. Петров, Н.В. Пигарева, А.Т. Николаев // Биопрепараты. – 2011. – № 1 (41). – С. 16 – 21.
103. Симбирцев А.С. Цитокины в лабораторной диагностике / А.С. Симбирцев, А.А. Тотолян // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. – 2015. - №2. - С. 82-98.
104. Соловьева И.А. Современные представления о роли CD38 в патогенезе бронхиальной астмы / И.А. Соловьева, Е.А. Собко, А.Ю. Крапошина и др. // Пульмонология. – 2013. - №5. – С.81-84.
105. Топорков А.В. Перспективы профилактики сапа и мелиоидоза / А.В. Топорков, Д.В. Викторов, И.А. Лебедева, С.И. Жукова // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. – 2017. - №3. - С.131-138.
106. Ушкалова Е.А. Соединения на основе мурамилпептидов в современной медицине: фокус на глюкозаминилмурамилдипептид / Е.А. Ушкалова, С.К. Зырянов, К.Э. Затолочина // Терапевтический архив. - 2019. - Т. 91. - №12. - С. 122-127.
107. Филатов О.Ю. Морфофизиологические принципы иммунологического действия ДНК эукариот / О.Ю. Филатов, О.В. Кашаева, Д.Ю. Бугримов и др. // Российский Иммунологический журнал. — 2013. — Т.7. (16). - № 4. – С. 385-390.

108. Филиппенко А.В. Совершенствование специфической профилактики холеры с помощью иммуномодуляторов / А.В. Филиппенко, Н.Д. Омельченко, Н.И. Пасюкова, А.А. Труфанова, И.А. Иванова // Медицинская иммунология. – 2021. - № 23(4). – С.915-920.
109. Фирстова В.В. Определение экспрессии маркера ранней активации CD69 на лимфоцитах иммунных мышей после стимуляции их антигенами чумного микроба / В.В. Фирстова, И.В. Бахтеева, Г.М. Титарева, Е.В. Зырина, С.А. Иванов, и др. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2010. - №103. – С.56-59.
110. Хабарова И.А. Экстренная профилактика экспериментального мелиоидоза с использованием синтетических иммуномодуляторов и гетерологичных вакцин / И.А. Хабарова, С.И. Жукова, К.А. Ротов, Е.А. Снатенков, А.В. Топорков, Д.В. Викторов // Вестник РУДН. Серия: Медицина. - 2018. - №3(22). - С.340-350.
111. Хаитов Р.М. Иммуномодуляторы: мифы и реальность // Иммунология. – 2020. – Т.41, №2. – С.101-106.
112. Харит С.М. Применение тимогена для повышения эффективности иммунизации против кори и паротита у детей, проживающих в экологически неблагоприятных регионах / С.М. Харит, Е.П. Началова, С.В. Петленко // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2005. - № 2. – С. 15 - 21.
113. Чеботарева Т.А. Современные возможности повышения эффективности вакцинации против гриппа у детей высокого риска заболеваемости / Т.А. Чеботарева, С.К. Каряева и др. // Иммунология. – 2011. - № 3. – С. 146 – 150.
114. Чеснокова Н.П. Закономерности нарушений иммунного и цитокинового статусов на фоне проведения неoadъювантной полихимиотерапии при раке молочной железы и возможности их медикаментозной коррекции / Н.П. Чеснокова, В.Ю. Барсуков, О.А. Злобнова // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 1.

115. Чубарян В. Т. Деринат при туберкулезе. анализ опыта применения / В. Т. Чубарян, Е. И. Митченко, К. С. Мильчаков // Вестник ВолгГМУ. – 2016. - Выпуск 1 (57). - С. 16-21.
116. Чувиров Д.Г., Ярцев М.Н. Клинико-иммунологическая эффективность ликопида у детей с повторными инфекциями верхних дыхательных путей // Иммунология. – 2000. - № 2. – С.48–50.
117. Шахгильдян И.В. Результаты изучения эффективности массовой вакцинопрофилактики гепатита В в отдельных регионах Российской Федерации / И.В. Шахгильдян, П.А. Хухлович, О.Н. Ершова и др. // Биопрепараты. – 2010. - № 3 (39). – С. 29 - 30.
118. Щуковская Т.Н. Характеристика популяций Т- и В- лимфоцитов в организме экспериментальных животных в процессе формирования иммунитета к холере /Т.Н. Щуковская, В.Н. Корсуков // Патолог. физиол., иммунол. и аллергол. особо опасн. инф. – Саратов, 1984. – С. 70-76.
119. Щуковская Т.Н. Влияние полиоксидония, Poly (I:C), даларгина на защитное действие вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ при экспериментальной чуме / Т.Н. Щуковская, А.Ф. Курылина, Н.Ю. Шавина, С.А. Бугоркова // Российский иммунологический журнал. – 2020. - № 23(1). – С.41-50.
120. Щуковская Т.Н. Оценка действия азоксимера бромида (полиоксидония) на адгезивные свойства вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ по данным атомно-силовой микроскопии / Т.Н. Щуковская, А.Ю. Гончарова, С.А. Бугоркова, П.С. Ерохин, О.М. Кудрявцева // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2021. - №98(3). – С.298–307.
121. Щуковская Т. Н. Повышение иммуногенной и протективной активности вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ в условиях культивирования с азоксимером бромида (полиоксидонием) / Т. Н. Щуковская, А. Ю. Гончарова, С. А. Бугоркова, О. М. Кудрявцева, Н. Е. Щербакова, А. С. Абдрашитова // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2021. - №20(6). - С.12–19.

122. Юрьева О. В. Перспективы использования синтетических селенорганических соединений для коррекции метаболического и иммунного статуса при вакцинальных процессах, вызванных живыми аттенуированными вакцинами против особо опасных инфекций / О. В. Юрьева, В. И. Дубровина, А. Б. Пятидесятникова // *Acta biomedica scientifica*. – 2021. - № 6 (3). – С.60–69.
123. Янов Д.С. Разработка методического подхода к созданию рекомбинантного штамма-продуцента субъединицы В холерного токсина / Д.С. Янов, С.Н. Клинова, А.В. Миронин, И.В. Живов, И.П. Погорельский, и др. // *Проблемы особо опасных инфекций*. – 2010. - №(4(106)). – С.62-65.
124. Ярилин А. А. Иммунология // Учеб. для студентов мед.вузов, ГЭОТАР-Медиа. – 2010. – 752с.
125. AbdelAllah N. Chitosan and alginate salt as biomaterials are potential natural adjuvants for the killed cholera vaccine / N. AbdelAllah, U. Gaber, S. Abdelghani, Ya. Rashid, A.F. Azmi // *Proceedings of J Biomed Mater A*. – 2022. - Vol. 109. - № 12). – P. 2462-2470.
126. Al buti A. A Type II NKT cell agonist, Sulfatide, is an effective adjuvant for oral cholera vaccines killed by fever / A. Al buti, S. Langet, S.R. Mcenti, S.Queen, A. Liddico, et al. // *Vaccines (Basel)*. – 2021. - Vol.9, №6. – P.619.
127. Al Nabhani Z. NOD2: the intestinal gate keeper / Z. Al Nabhani, G. Dietrich, J.-P. Hugot, F. Barreau // *PLoS Pathog*. – 2017. - № 13 (3): e1006177.
128. Ali M. Herd immunity conferred by killed oral cholera vaccines in Bangladesh: a Reanalysis / M. Ali, M. Emch, L. von Seidlein, M. Yunus, D.A. Sack, et al. // *Lancet*. – 2005. - Vol. 366(9479). – P.44–9.
129. Amemia K. Oligodeoxynucleotides CpG enhance the immune response of mice to the *Yersinia pestis* F1-V vaccine in bubonic and pulmonary plague models / K. Amemia, J.L. Myers, T.E. Rogers, R.L. Fast, A.D. Bassett, et al. // *The vaccine*. – 2009. – 27. – P.2220-9.

130. Apostólico JS. Adjuvants: classification, modus operandi, and licensing / JS. Apostólico, VA. Lunardelli, FC. Coirada, SB. Boscardin, DS. Rosa // J Immunol Res. - 2016. – 2016. – P.1459394.
131. Aricò E. Interferon- α as adjuvants of antiviral and antitumor vaccines: mechanisms of action and response signature / E. Aricò, F. Belardelli // J Cytokines interferon. – 2012. - June. - Vol. 32(6). – P.235-47.
132. Azegami T. New vaccines based on transgenic rice / T. Azegami, X. Ito, X. Kimono, Y. Yuki // Arch Immunol The Exp (Warsz). – 2015. - Vol. 63, №2. – P.87-99.
133. Azman A.S. Effectiveness of one dose of oral cholera vaccine in response to an outbreak: a case-cohort study / A.S. Azman, L.A. Parker, J. Rumunu, F. Tadesse, F. Grandesso, et al. // Lancet Glob. Health. – 2016. - Vol. 4(11). – P.856-e863.
134. Baik Y.O. A Randomized, non-inferiority trial comparing two bivalent killed, whole cell, oral cholera vaccines (Euvichol vs Shanchol) in the Philippines / YO. Baik, SK. Choi, RM. Olveda, RA. Espos, AD. Ligsay, et al // Vaccine. – 2015. - Vol. 33(46). – P.6360–5.
135. Baron S.D. Inactivated *Francisella tularensis* live vaccine strain protects against respiratory tularemia by intranasal vaccination in an immunoglobulin A-dependent fashion / S.D Baron, R. Singh, D.W. Metzger // Infect. Immun. – 2007. - Vol. 75, № 5. – P. 2152 - 2162.
136. Bastola R. Vaccine adjuvants: smart components to boost the immune system / R. Bastola, G. Noh, T. Keum, S. Bashyal, J.E. Seo, J. Choi et al. // Arch Pharm Res. 2017. - 40(11). – P.1238–48.
137. Bernasconi V. The vaccine combination of lipid nanoparticles and an adjuvant derivative of cholera toxin significantly improves the protection of the lungs from infection caused by the influenza virus / V. Bernasconi, K. Norling, I. Gribonika, L.K. Ong, S. Burazerovich, et al. // Mucosal immunol. – 2021. - № 14 (2). – P.523-536.

138. Bhattacharya S.K. 5 year efficacy of a bivalent killed wholecell oral cholera vaccine in Kolkata, India: a clusterrandomised, double-blind, placebo-controlled trial / SK. Bhattacharya, D. Sur, M. Ali, S. Kanungo, YA. You, et al. // Lancet Infect Dis. – 2013. - Vol. 13(12). – P.1050–6.
139. Bishop A.L. Immunization of mice with *Vibrio cholerae* outer-membrane vesicles protects against hyperinfectious challenge and blocks transmission / A.L. Bishop, A.A. Tarique, B. Patimalla, S.B. Calderwood, F. Kadri et al. // Journal of Infectious Diseases. – 2012. - Vol. 205(3). - P. 412-421.
140. Burrows, W. Animal models of cholera /W. Burrows, R.B. Sack // Cholera / Ed. D. Barua, W. Burrows // Philadelphia. - 1974. - Ch.9. - P. 189 - 205.
141. Chen W.H. Single-Dose live oral cholera vaccine CVD 103-HgR protects against human experimental infection with *Vibrio Cholerae* O1 El Tor / WH Chen, M.B. Cohen, B.D. Kirkpatrick, R.C. Brady, D. Galloway, et al. // Clin Infect Dis. – 2016. - Vol. (11). – P.1329–35.
142. Chen X. Emerging adjuvants for intradermal vaccination. Int J Pharm. 2023 Feb 5;632:122559.
143. Chong S. Scalable production and immunogenicity of conjugated cholera vaccine / S. Chong, M. Kelly, J. Yun, B. Lee, M. Park, et al. // Vaccine. – 2021. – Vol. 39. - № 47. – P. 6936-6946.
144. Chowdhury F. A study to assess the safety, tolerability and immunogenicity of two formulations of the inactivated (Hikojima serotype) new oral cholera vaccine Hillchol™ / F. Chowdhury, K. Syed, A. Singh, A. Actor, T. Rahman, et al. // Joint Medical Sciences program of the USA and Japan. Seoul. South Korea. - February 9-10. – 2017. - session 36.
145. Chowdhury F. A phase I/II study to evaluate safety, tolerability and immunogenicity of Hillchol®, an inactivated single Hikojima strain based oral cholera vaccine, in a sequentially age descending population in Bangladesh / F. Chowdhury, K. Ali Syed, A. Akter, T. Rahman Bhuiyan, I. Tauheed, et al. // Vaccine. – 2021. –Jul. - Vol. 22, № 39 (32). – P.4450-4457.
146. Chowdhury F. A non-inferiority trial comparing two killed, whole cell, oral

cholera vaccines (Cholvax vs. Shanchol) in Dhaka, Bangladesh / F. Chowdhury, A. Akter, T.R. Bhuiyan, I. Tauheed, S. Teshome, et al. // *Vaccine*. – 2022. – Jan. – 28;40(4). – P.640-649.

147. Clemens J.D. Cholera / J.D. Clemens, G.B. Nair, T. Ahmed, F. Qadri, J. Holmgren // *Lancet*. – 2017. - Vol. 390(10101). – P.1539–49.

148. Davit Zh.K. Alfagalactosylceramide increases mucosal immunity to oral whole-cell cholera vaccines / Zh.K. Davit, S. Langet, A. Al buti, B. Aversa, S. Nordqvist, et al. // *Mucosal immunal*. – 2019. - Vol.12, №4. – P.1055-1064.

149. Desai S.N. An overview of cholera vaccines and their public health implications / S.N. Desai, J.D. Clemens // *Curr. Opin. Pediatr*. – 2012. – Vol. 24 (1). – P.85-91.

150. Di Pasquale A. Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond / A. Di Pasquale, S. Preiss, F. Tavares Da Silva, N. Garçon // *Vaccines (Basel)*. – 2015. – 3(2). – P.320 – 343.

151. Di Stefano A. Bronchial inflammation and bacterial load in stable COPD is associated with TLR4 overexpression / A. Di Stefano, F.L.M. Ricciardolo, G. Caramori, I.M. Adcock et al. // *Eur. Respir J*. - 2017. - № 49 (5). pii: 1602006.

152. Dikman L. A. Preparation and characterization of antibodies to protective antigens *Vibrio cholerae* conjugated with gold nanoparticles / L.A. Dikman, O.A. Volokh, O.V. Gromova, O.S. Durakova, S.Vorobyeva, et al. // *Dokl Biochemistry Biophysics*. – 2020. - Vol.490, №1. – P.19-21.

153. Dragunsky E.M. Experimental evaluation of antitoxic protective effect of new cholera vaccines in mice / E.M. Dragunsky, E. Rivera, W. Aaronson, et al. // *Vaccine*.- 1992. -Vol.10. - № 11.- P.735-736.

154. Duckett N.S. Intranasal interleukin-12 treatment for protection against respiratory infection with the *Francisella tularensis* live vaccine strain / N.S. Duckett, S. Olmos, D.M. Durrant, D.W. Metzger // *Infect Immun*. – 2005. - Vol. 73. - № 4. - P. 2306-2311.

155. Eko F.O. Evaluation of a broadly protective *Chlamydia-cholera* combination vaccine candidate / F.O. Eko, D.N. Okenu, U. Singh, et al. // *Vaccine*. - 2011. - Vol.29, № 21. - P.3802-3810.
156. Ellis C.N. Comparative proteomic analysis reveals activation of mucosal innate immune signaling pathways during cholera / C.N. Ellis, R.C. LaRocque, T. Uddin, B. Krastins, L. Mayo-Smith, et al. // *Infect. Immun.* - 2015. - Vol. 83, № 3. - P. 1089-1103.
157. Facciola A. Overview of vaccine adjuvants: current data and future prospects / A. Facciola, G. Visalli, A. Laganà, A. Di Pietro // *Vaccines (Basel)*. – 2022. - Vol.10, №5. – P.819. doi: 10.3390/vaccines10050819
158. Fernández S. Evaluation of enteric-coated tablets as a whole cell inactivated vaccine candidate against *Vibrio cholerae* / S. Fernández, G. Año, J. Castaño, Y. Pino, E. Uribarri, et al. // *Travel. Med. Infect. Dis.* – 2013. - Vol.11, № 2. - P. 103-109.
159. Firdaus F.Z. Developments in Vaccine Adjuvants / F.Z. Firdaus, M. Skwarczynski, I. Toth // *Methods Mol Biol.* – 2022. - № 2412. – P.145-178.
160. Galloway D.R. The magnitude of the germinal center B cell and T follicular helper cell response predicts long-lasting antibody titers to plague vaccination / D.R. Galloway, N.X. Nguyen, J. Li, N. Houston, G. Gregersen, E.D. Williamson, F.W. Falkenberg, J.N. Herron, J.S. Hale // *Front Immunol.* - 2022 Oct 28;13:1017385.
161. Gao Y. Research progress in the development of natural-product-based mucosal vaccine adjuvants / Y. Gao, Y. Guo // *Front Immunol.* – 2023. - Apr 5. - №14. – P.1152855.
162. Giannini S. Enhanced humoral and memory B cellular immunity using HPV16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only / S. Giannini, E. Hanon, P. Moris, M. Van Mechelen, S. Morel, F. Dessy, M. Fourneau, B. Colau, J. Suzich, G. Losonksy, M. Martin, G. Dubin, M. Wettendorff // *Vaccine*. – 2006. - № 24 (33–34). – P. 5937–49.

163. Hao X. The effect of fully trans-retinoic acid on immune cells and the development of its formulation for vaccines. / X. Hao, X. Zhong, X. Sun // AAPS J. February 24. – 2021. - 23(2). – P.32.
164. Holmgren J. Whole-cell vaccines and methods of their production / J. Holmgren, M. Lebens // PCT/EP/083082, November 25. – 2019. -WIPO; Geneva, Switzerland.
165. Hu H. Enhancing immune responses against SARS-CoV nucleocapsid DNA vaccine by co-inoculating interleukin-2 expressing vector in mice / H. Hu, L. Tao, Y. Wang, L. Chen, J. Yang et al. // Biotechnological Letters. – 2009. - Vol. 31(11). – P.1685-1693.
166. Hubbard T.P. A live vaccine quickly protects against cholera on a baby rabbit model / T.P. Hubbard, G. Billings, T. Dor, B. Sit, A.R. Warr // sci. Translated by Med. - 2018. – №10. - eaap8423.
167. Iho S. Oligodeoxynucleotides CpG as mucosal adjuvants / S. Iho, J. Moema, F. Suzuki // Hum Vaccines Immunotherapy. – 2015. - Vol. 11(3). –P.755-60.
168. Jackson E.M. Intranasal murabutide vaccination enhances humoral and mucosal immune responses to a vaccine with virus-like particles / E.M. Jackson, M.M. Herbst-Kralovets // PLoS One. – 2012. – Vol. 7(7). – P. e41529.
169. Karimi Bavandpour A. The role of mesoporous silica and carbon nanoparticles in antigen stability and intensity of immune response against recombinant subunit B of cholera toxin in rabbit model / A. Karimi Bavandpour, B. Bakhshi, S. Najjar-Peeraye // Int J Pharm. – 2020. - Vol.5, №573. – P.118868.
170. Karlsson S.L. Development of stable vaccine strains of *Vibrio cholerae* O1 type Hikojima, coexpressing lipopolysaccharide antigens Inaba and Ogawa / S.L. Karlsson, E. Exa, S. Nygren, M. Kallgrad, A. Blomqvist, et al. // PLoS ONE. – 2014. - № 9. – e108521.
171. Karpov DS. A Strategy for the Rapid Development of a Safe *Vibrio cholerae* / D.S. Karpov, A.V. Goncharenko, E.V. Usachev, D.V. Vasina, E.V. Divisenko, et al. // Candidate Vaccine Strain. Int J Mol Sci. – 2021. –Oct. - 28;22(21):11657.

172. Kashima K. Good manufacturing practice production of an oral cholera vaccine without purification expressed in transgenic rice plants / K. Kashima, U. Yuki, M. Mejima, S. Kurokawa, U. Suzuki, et al. // *Representative of Plant Cells*. – 2016. - Vol. 35, №3. – P.667-79.
173. Khimki A. J. Intranasal prophylaxis with oligodeoxynucleotide CpG can protect against *Yersinia pestis* infection / A.J. Khimki, J. Lynn, L.V. Kumar, F.M. Saba, D.K. Dusha, et al. // *Infect with an Immunomodulator*. – 2013. – 81. – P.2123-32. doi:10.1128/IAI.00316-13
174. Kuchta A. *Vibrio cholerae* O1 infection induces pro-inflammatory CD4+ T cell responses in blood and intestinal mucosa of infected humans / A. Kuchta, T. Rahman, E.L. Sennott, T.R. Bhuyian, T. Uddin, et al. // *Clin. Vaccine Immunol.* - 2011. - Vol. 18, № 8. - P. 1371-1377.
175. Kumar D. Intranasal administration of an inactivated *Yersinia pestis* vaccine with interleukin-12 generates protective immunity against pneumonic plague / D. Kumar, G. Kirimanjeswara, D.W. Metzger // *Clin. Vaccine Immunol.* – 2011. - Vol. 18, № 11. - P. - 1925 – 1935.
176. Kupriyanov V.V. The combination of three adjuvants increases the immunogenicity of a recombinant protein containing CTL epitopes of nonstructural hepatitis C virus proteins / V.V. Kupriyanov, L.I. Nikolaeva, A.A. Zykova, A.V. Dedova, A.E. Grishechkin // *Virus Research*. – 2020. – Vol. 284. - July 15. – P.197984.
177. Kiefer M.E., Patel A.M., Hollingsworth S.A., In Siganesh.M. Low molecular weight toll-like receptor agonists 7 and 8: review of patents for 2014-2020. *Expert opinion. Ther. Pat.* 2020; 30: 825-845. doi: 10.1080/13543776.2020.1825687
178. Laik N. DP-ribosylating enterotoxins as vaccine adjuvants / N. Laik, S. Lebrero-Fernandez // *Pharmacol KurOpin.* – 2018. – August. - Vol. 41. – P.42-51.
179. Laupèze B. Adjuvant systems for vaccines: 13 years of post-licensure experience in diverse populations have progressed the way adjuvanted vaccine safety is investigated and understood / B. Laupèze, C. Hervé, A. Di Pasquale, Da. Tavares, F.Silva // *Vaccine*. - 2019. - Vol. 37(38). – P.5670–80.

180. Lauw F.N. The CXC chemokines gamma interferon (IFN-gamma) –inducible protein10 and monokine induced by IFN -gamma are released during severe melioidosis / F.N. Lauw, A.J. Simpson, J.M. Prins et al. // *Infect. Immun.* - 2000. - Vol. 68. - P. 2034-2042.
181. Lebens M. Construction of novel vaccine strains of *Vibrio cholerae* co-expressing the Inaba and Ogawa serotype antigens / M. Lebens, S.L. Karlsson, S. Kallgard, M. Blomqvist, A. Ekman, et al. // *Vaccine.* - 2011. - Vol. 29, № 43. - P. 7505-7513.
182. Ledón, T. TLP01, an mshA mutant of *Vibrio cholerae* O139 as a vaccine candidate against cholera / T. Ledón, B. Ferrán, C. Pérez et al. // *Microbes Infect.* – 2012. – Vol. 14, № 11. - P. 968-978.
183. Leitner D.R. Lipopolysaccharide modifications of a cholera vaccine candidate based on outer membrane vesicles reduce endotoxicity and reveal the major protective antigen / D.R. Leitner, S. Feichter, K. Schild-Prüfert, G.N. Rechberger, J. Reid, et al. // *Infect Immun.* – 2013. - Vol. 81(7). – P. 2379–2393.
184. Leitner D.R. A combined vaccine approach against *Vibrio cholerae* and ETEC based on outer membrane vesicles / D.R. Leitner, S. Lichtenegger, P. Temel, F. G. Zingl, D. Ratzberge, et al. // *Front Microbiol.* - 2015. - Vol. 6. – P. 823.
185. Leung D.T. Immune Responses to Cholera in Children / D.T. Leung, F. Chowdhury, S.B. Calderwood, F. Qadri, E.T. Ryan // *Expert Rev Anti Infect Ther.* – 2012. - Vol. 10(4). – P.435–44
186. Levin M.M. PaxVax CVD 103-HgR single live oral cholera vaccine / M.M. Levin, W.H. Chen, J.B. Kaper , M. Locke, L. Danzig, M. Gurvit // *Expert Rev Vaccines.* – 2017. - Vol. 16. - P.197-213.
187. Lee W. Vaccine adjuvants to engage the cross-presentation pathway / W. Lee, M. Suresh // *Front Immunol.* – 2022. - Aug 1;13:940047.
188. Li Zi. The synergy of mIL-21 and mIL-15 in increasing the effectiveness of the DNA vaccine against acute and chronic *Toxoplasma gondii* infection in mice /

- Zi. Li, J. Chen, E. Petersen, DH. Zhou, SY. Huang, et al. // *Vaccine*. – 2014. - Vol. 32(25). – P.3058-3065.
189. Li Q. Built-in adjuvants for use in vaccines / Q. Li, Z. Li, N. Deng, F. Ding, Y. Li, H. Cai // *Eur J Med Chem*. – 2022 - Jan 5;227:113917.
190. Lin X. Oil-in-ionic liquid nanoemulsion-based adjuvant simultaneously enhances the stability and immune responses of inactivated foot-and-mouth disease virus / X. Lin, Y. Yang, S. Li, Z. Li, Y. Sheng, Z. Su, S. Zhang // *Int J Pharm*. - 2022 Sep 25;625:122083.
191. Liu R. Rabies virus lipopeptide conjugated to a TLR7 agonist improves the magnitude and quality of the Th1-biased humoral immune response in mice / R. Liu, J. Wang, Y. Yang, N. Zhu. // *Virology*. – 2016. – Vol. 497. – P.102 - 110.
192. Longet S. Oral adjuvant *Helicobacter pylori* vaccine with α -galactosylceramide induces protective IL-1R- and IL-17R-dependent Th1 reactions / S. Longet, A. Obotret-Delhi, C.H. David, C.P. McEntee, B. Aversa, et al. // *NPJ vaccines*. October 25. – 2019. - Vol. 4. – P. 45.
193. Lopez A.L. Killed oral cholera vaccines: history, development and implementation challenges / A.L. Lopez, M.L. Gonzales, J.G. Aldaba, G.B. Nair // *Ther. Adv.Vaccines*. – 2014. - Vol. 2(5). – P.123-36.
194. Lopez Y. Pharmacology and toxicology of an oral tablet whole cells inactivated cholera vaccine in Sprague Dawley rats / Y. Lopez, J.F. Infante, S. Sifontes, D. Diaz , V. Perezet, et al. // *Vaccine*. - 2011. - Vol. 29, № 19. - P. 3596-3599.
195. Ma J. CpG/Poly (I:C) mixed adjuvant priming enhances the immunogenicity of a DNA vaccine against eastern equine encephalitis virus in mice / J. Ma, H. Wang, X. Zheng, X. Hong Xue, B. Yan, et al. // *International immunopharmacology*. - 2014. - Vol. 19(1). – P.74-80.
196. Magalhaes J.G. Nod2-dependent Th2 polarization of antigen - specific immunity / J.G. Magalhaes, J.H. Fritz, L. Le Bourhis, G. Sellge, L.H. Travassos, T. Selvanantham, et al // *J Immunol*. – 2008. - № 181(11). – P.7925-35.

197. Mehrabi M. Chitosan-based nanoparticles during vaccine delivery to mucous membranes / M. Mehrabi, N. Montazeri, N. Mohammadpour Dungi, A. Rusty, vol R. Vakili-Map // Arch Razi Inst. – 2018. – September. - Vol. 73(3). – P.165-176.
198. Meyer C.U. Principles in immunology for the design and development of vaccines / C.U. Meyer, F. Zepp // Methods Mol Biol. - 2022;2410:27-56.
199. Mizel S.B. Flagellin-F1-V fusion protein is an effective vaccine against plague in mice and two species of non-human primates / S.B. Mizel, A. Graff, N. Sriranganathan, S. Erwin, S.J. Lees et al. // Immunol Vaccines Wedge. – 2009. – 16. – P.21-8.
200. Mohan T. The use of chemokines as adjuvants for immunotherapy with vaccines / T. Mohan, Sh. Zhu, Yi. Wang, B-Z. Wang // Immunobiology. - 2018. - June-July. - Vol. 223(6-7). – P.477-485.
201. Montero D. A. *Vibrio cholerae*, classification, pathogenesis, immune response, and trends in vaccine development / D.A. Montero, R.M. Vidal, J. Velasco, S. George, Y. Lucero, L.A Gómez, L.J. Carreño, R. García-Betancourt, M. O’Ryan // Front Med (Lausanne). - 2023. -5;10:1155751.
202. Moyer T. J. Beyond antigens and adjuvants: formulating future vaccines / T. J. Moyer, A.C. Zmolek, A. Irvine // J Clin Invest. – 2016. – 126(3). – P.799-808.
203. Naderi M. Interleukin-12 as a genetic adjuvant enhances hepatitis C virus NS3 DNA vaccine immunogenicity / M. Naderi, A. Saeedi, A. Moradi, M. Kleshadi, M. Reza Zolfagari et al. // Virologica Sinica. – 2013. - Vol. 28(3). – P.167–173.
204. Naidu A. Mucosal and systemic immune responses to *Vibrio cholerae* infection and oral cholera vaccines (OCVs) in humans: a systematic review / A. Naidu, S. S Lulu // Expert Rev Clin Immunol. – 2022. - №18(12). – P.1307-1318.
205. Noh K. The efficacy of a 2,4-diaminoquinazoline compound as an intranasal vaccine adjuvant to protect against influenza A virus infection in vivo / K. Noh, E.J. Jeong, T. An, J.S. Shin, H. Kim, S.B. Han, M. Kim // J Microbiol. - 2022 May;60(5):550-559.

206. O'Neill K.L. Supramolecular vaccine systems based on peptides / K.L. O'Neill, P.C. Shrimali, Z.P. Klapaks, M.A. Files, J.S. Rudra // *Acta Biomater.* – 2021. – Vol.1. - № 133. – P.153-167.
207. Ou B. Current progress and challenges in the study of adjuvants for oral vaccines / B. Ou, Y. Yang, H. Lv, X. Lin, M. Zhang // *BioDrugs.* - 2023 Mar;37(2):143-180.
208. Park D.B. Creation of a divalent vaccine against anthrax and smallpox using weakened smallpox vaccine virus KVAC103 / D.B. Park, Bae Ahn, H. Song, IL. Lee, IL. Kim, et al // *BMC Microbiol.* – 2021. - № 21 (1): 76.
209. Pastor M. An approach to cold chain free oral cholera vaccine: in vitro and in vivo characterization of *Vibrio cholerae* gastro-resistant microparticles / M. Pastor, A. Esquisabel, A. Talavera, G. Año, S. Fernández, et al. // *Int. J. Pharm.* – 2013. - Vol. 448(1). – P.247-58.
210. Photoukhi F. Adjuvant use of the NKT-cell agonist alpha-galactosylceramide leads to an increase in the immunogenicity of the DNA vaccine based on M2 and protective immunity against influenza virus A / F. Photoukhi, M. Shaffifar, B. Faramant, S. Width, M. SaeidiArch et al. // *Virol.* – 2017. - Vol.162. - 1251-1260.
211. Pollitzer R. Cholera. Ch. 9. Symptomatology, diagnosis, prognosis and treatment //WHO, Geneva.-1959.-P.766-781.
212. Propst K. L. Immunotherapy markedly increases the effectiveness of antimicrobial therapy for treatment of *Burkholderia pseudomallei* infection / K. L. Propst, R. M. Troyer, L. M. Kellihan, S.V. Doe // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2010. - Vol. 54. - № 5. - P.1785–1792.
213. Pulendran B. S. New concepts in the science of adjuvant for vaccines / B. S. Pulendran, P. Arunachalam, D.T. O'Hagan // *Nat Rev Drug Discovery* 20. – 2021. – P.454-475. doi: 10.1038/s41573-021-00163-y
214. Raahati Z. Selenium nanoparticles induce powerful protective immune reactions against vibrio cholera vaccine in a mouse model / Z. Raahati, B. Bakhshi, S. Najjar-Peeraye // *J Immunol Res.* - 2020; 2020: 8872288.

215. Ren S.T. Intranasal immunization using Mannatide as a new adjuvant for inactivated influenza vaccine and its adjuvant effect compared to MF59 / S.T. Ren, H.M. Zhang, P.F. Sun, L.J. Sun, X. Guo et al. // PLoS One. – 2017. - January 4. – Vol. 12(1). - P. e0169501.
216. Russell P.H. A rapid enzyme-linked semi-microwell assay for the enumeration of antibody-forming cells to viral and bacterial antigens in domestic animals / P.H. Russell, D.K.J. Mackay, I. Ozdemir // J. Immunol. Meth. - 1987. - Vol. 101, № 2. - P. 229-233.
217. Sajadian A. Comparing the effect of Toll-like receptor agonist adjuvants on the efficiency of a DNA vaccine / A. Sajadian, A. Tabarraei, H. Soleimanjahi, F. Fotouhi, A. Gorji et al. // Archives of virology. – 2014. - Vol. 159(8). – P.1951-1960.
218. Singleton K.L. Overview: current trends, problems and success stories in adjuvant research / K.L. Singleton, A. Joffe, V.V. Leitner // The front. Immunol. – 2023. - №14. – P.1105655. doi: 10.3389/fimmu.2023.1105655
219. Shaikh H. Current and future cholera vaccines / H. Shaikh, J. Lynch, J. Kim, J.L. Excler. // Vaccine. - 2020 Feb. - 29; 38 Suppl 1. –P. A118-A126.
220. Sharma M.K. Expression of toxin co-regulated pilus subunit A (TCPA) of *Vibrio cholerae* and its immunogenic epitopes fused to cholera toxin B subunit in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum*) / M.K. Sharma, N.K. Singh, D. Jani, R. Sisodia, M. Thungapathra, et al. // Plant Cell Rep. – 2008. – Feb. - Vol. 27, №2. – P. 307-18.
221. Sharma T. Development of Hillchol ®, an inexpensive inactivated single strain of oral vaccine against Hikojima cholera / T. Sharma, N. Joshi, A. Kumar Mandyal, S.L. Nordqvist, M. Lebens, et al. // Vaccine. – 2020. – November. - Vol. 25, № 38 (50). – P.7998-8009.
222. Sinclair D. Oral Vaccines for Preventing Cholera / D. Sinclair, K. Abba, K. Zaman, F. Qadri, P.M. Graves // Cochrane Database Syst Rev. – 2011. - (3): CD008603.

223. Sinha R. Pretreatment with retinoic acid suppresses acute inflammation caused by vesicles of the outer shell of *Vibrio cholerae*, and increases the immunity of the mucous membrane / R. Sinha, Dr. Haulader, A.Ta, S. Mitra, S. Das, H.Koli // Vaccine. – 2017. – Vol. 35. - № 28. – P. 3534-3547.
224. Sit B. "Cholera vibrio". The area is not large. / B. Sit, T. Zhang, B. Fak o ya, A. After, et al., // Trope. Dis. – 2019. - № 13:e0007417.
225. Su B. Sequential introduction of cytokine genes to enhance cellular immune responses and CD4 (+) memory T cells during DNA vaccination / B. Su, J. Wang, G. Zhao, H. Wang, J. Li et al. // Vaccines and immunotherapeutic drugs for humans. - 2012. - Vol. 8(11). – P.1659-1667.
226. Sun B. Polysaccharides as vaccine adjuvants / B. Sun, D. Zhao, S. Guo, S. Wang, K. Zhao // Vaccine. August 23. – 2018. - Vol. 36(35). – P.5226-5234.
227. Sur D. Efficacy of a low-cost, inactivated whole-cell oral cholera vaccine: results from 3 years of follow-up of a randomized, controlled trial / D. Sur, S. Kanungo, B. Sah, B. Manna, M. Ali, et al. // PLoS Negl Trop Dis. –2011. - Vol. 5(10). - e1289.
228. Tabrizi N.M. Preparation and evaluation of chitosan nanoparticles containing ctxB antigen against *Vibrio cholera* / N.M. Tabrizi, J. Amani, M. Ebrahimzade, S. Nazaryan, R. Kazimi, P. Almasian // Microbial Patong. – 2018. -Nov. -№124. – P.170-177.
229. Thiem V.D. Long-term effectiveness against cholera of oral killed whole-cell vaccine produced in Vietnam // V.D. Thiem, J.L. Deen, L. von Seidlein, D.G. Canh, D.D. Anh, et al. // Vaccine. – 2006. - Vol. 24(20). – P.4297–303.
230. Tokuhara D. Secretory IgA-mediated protection against *Vibrio cholerae* and heat-labile enterotoxin-producing enterotoxigenic *Escherichia coli* by rice-based vaccine / D. Tokuhara, Y. Yuki, T. Nochi, T. Kodama, M. Mejima, et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. - 2010. - Vol. 107, № 19. - P. 8794-8799.
231. Vishwakarma V. Cholera toxin-B (ctxB) antigen expressing *Salmonella typhimurium* polyvalent vaccine exerts protective immune response against *Vibrio*

cholerae infection / V. Vishwakarma, S.S. Sahoo, S. Das, S. Ray, W.D. Hardt, M. Suar // Vaccine. – 2015. - Vol. 33, № 15. - P.1880-1889.

232. Weil A. A. *Vibrio cholerae* at the intersection of immunity and the microbiome. A.A. Weil, R.L. Becker, J.B. Harris // mSphere. - 2019. 27;4(6):e00597-19.

233. Yamanaka X. The vaccine against nasal interleukin-12 DNA, expressing the fusion protein Yersinia pestis F1-V, provides protection against pneumonic plague / X. Yamanaka, T. Hoyt, X. Yang, S. Golden, K. M Bosio, et al. // Infection and immunity. – 2008. - Vol. 76(10). – P. 4564-4573.

234. Yang Sh. Correlation of antiviral T-cell reactions with suppression of viral rebound in carriers of chronic hepatitis B: a study confirming the concept / Sh. Yang, K. Lee, Sh. Park, S. Im, Y. Kim, et al. // Jin Ter. – 2006. - Vol. 13(14). – P.1110-1117.