



# Повышение иммуногенной и протективной активности вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ с использованием синтетических иммуномодуляторов

Гончарова А.Ю.✉, Бугоркова С.А., Щуковская Т.Н.

Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия

## Аннотация

**Введение.** Одной из основных задач специфической профилактики чумы остаётся разработка вакцин и схем их применения, направленных на повышение эффективности вакцинации за счёт использования адъювантов и иммуномодуляторов.

**Цель исследования** — сравнительная оценка действия лекарственных препаратов из группы синтетических иммуномодуляторов на иммуногенные и протективные свойства вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ в модельных опытах на животных.

**Материалы и методы.** Белых мышей и морских свинок иммунизировали вакцинным штаммом *Y. pestis* EV линии НИИЭГ. Животным опытных групп вводили олигопептиды O1 (треонил-глутамил-лизил-лизил-аргинил-аргинил-глутамил-треонил-валил-глутамил-аргинил-глутамил-лизил-глутамат), O2 (глутамил-цистеинил-глицин динатрия) и O3 (аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинин) за 1 ч до вакцинации или трехкратно перед заражением. На 3, 14 и 21-е сутки исследовали антитело- и цитокинопродукцию. Заражали тест-штаммом *Y. pestis* 231(708) в дозе 400 ЛД<sub>50</sub>.

**Результаты.** Однократное введение иммуномодуляторов за 1 ч до вакцинации не влияло на значение средней иммунизирующей дозы (ImD<sub>50</sub>): 5860 (O1), 5860 (O2), 6454 (O3) и 6876 (контроль) КОЕ для белых мышей и 446 (O1), 551 (O2), 446 (O3) и 578 (контроль) КОЕ для морских свинок. Трехкратное введение препаратов вакцинированным животным с уже сформированным иммунитетом приводило к снижению показателей ImD<sub>50</sub> *Y. pestis* линии EV НИИЭГ в группе с O1 в 2,2 раза (мыши) и 1,8 раза (морские свинки), с O2 и O3 в 1,2 раза независимо от биомодели по сравнению с контролем. Установлено стимулирующее влияние O1 и O3 на продукцию антител к F1 чумного микроба и цитокинов интерферона-γ, интерлейкина-10.

**Заключение.** Выявлен стимулирующий потенциал синтетических иммуномодуляторов на иммунную систему биомоделей, иммунизированных *Y. pestis* линии EV НИИЭГ, что определяет перспективность исследований по совершенствованию схем вакцинопрофилактики чумы.

**Ключевые слова:** чума, живая чумная вакцина, иммуномодуляторы, протективность, иммуногенность, профилактика, цитокины

**Этическое утверждение.** Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010). Протокол исследования одобрен Комиссией по биоэтике Российского противочумного института «Микроб» (протоколы № 6 от 14.04.2021, № 11 от 07.12.2021, № 2 от 17.02.2022).

**Источник финансирования.** Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Для цитирования:** Гончарова А.Ю., Бугоркова С.А., Щуковская Т.Н. Повышение иммуногенной и протективной активности вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ с использованием синтетических иммуномодуляторов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100:online-first. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-335>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-335>

# Increasing the immunogenic and protective activity of the vaccine strain *Yersinia pestis* EV line NIEG using synthetic immunomodulators

Anastasiya Yu. Goncharova<sup>✉</sup>, Svetlana A. Bugorkova, Tatyana N. Shchukovskaya

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia

## Abstract

**Introduction.** One of the main tasks of specific plague prevention remains the development of vaccines and their application schemes aimed at improving the effectiveness of vaccination through the use of adjuvants and immunomodulators.

The **purpose** of the study were comparative evaluation of the effect of drugs from the group of synthetic immunomodulators on the immunogenic and protective properties of the *Yersinia pestis* EV line NIEG vaccine strain in model animal experiments.

**Materials and methods.** White mice and guinea pigs were immunized with the vaccine strain *Y. pestis* EV line NIEG. The animals of the experimental groups were injected with oligopeptides O1 (Threonyl-glutamyl-lysyl-lysyl-arginyl-arginyl-glutamyl-threonyl-valyl-glutamyl-arginyl-glutamyl-lysyl-glutamate), O2 (Glutamyl-cysteinyl-glycine disodium) and O3 (Arginyl-alpha-aspartyl-lysyl-valyl-tyrosyl-arginine) one hour before vaccination or three times before infection. On days 3, 14 and 21, antibody and cytokine products were studied. Animals were infected with the test strain *Y. pestis* 231(708) at a dose of 400 LD<sub>50</sub>.

**Results.** It was found that a single administration of immunomodulators 1 hour before vaccination did not change the susceptibility of animals to the plague microbe: ImD<sub>50</sub> = 5860 (O1); 5860 (O2); 6454 (O3) and 6876 (control) CFU for white mice and 446 (O1), 551 (O2), 446 (O3) and 578 (control) CFU for guinea pigs. Three-time administration of drugs to vaccinated animals led to a decrease in the ImD<sub>50</sub> *Y. pestis* EV line NIEG indicators in the group with O1 by 2.2 times (mice) and 1.8 times (guinea pigs), with O2 and O3 by 1.2 times, regardless of the biomodel compared with the control. The stimulating effect of O1 and O3 on the production of antibodies to F1 of the plague microbe and cytokines interferon-gamma, interleukin-10 has been established.

**Conclusion.** The stimulating potential of synthetic immunomodulators on the immune system of biomodels immunized by *Y. pestis* EV line NIEG has been demonstrated, which determines the prospects of research to improve the schemes of prophylactic vaccination against plague.

**Keywords:** *plague, live plague vaccine, immunomodulators, productivity, immunogenicity, prevention, cytokines*

**Ethics approval.** Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe" (protocols No. 6, April 14, 2021, No. 11, December 7, 2021, No. 2, February 17, 2022).

**Funding source.** This study was not supported by any external sources of funding.

**Conflict of interest.** The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**For citation:** Goncharova A.Y., Bugorkova S.A., Shchukovskaya T.N. Increasing the immunogenic and protective activity of the vaccine strain *Yersinia pestis* EV line NIEG using synthetic immunomodulators. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2023;100:online-first. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-335>

## Введение

Реализация современной парадигмы вакцинопрофилактики, обеспечиваемой разработкой дифференцированных подходов к вакцинации с целью создания эффективного иммунитета у каждого прививаемого человека, подразумевает возможность персонализированного использования разных доз и схем вакцинации, а также расширение арсенала адъювантов, иммуномодуляторов, цитокинов и дополнительных средств стимуляции иммунного ответа. В России для специфической профилактики чумы применяется вакцина чумная живая (ВЧЖ) производства Ставропольского научно-исследовательского противочумного института Роспотреб-

надзора и 48 Центрального научно-исследовательского института Министерства обороны РФ. Также лицензирован препарат — вакцина чумная молекулярная микроинкапсулированная (ВЧММ) для применения личному составу войск Министерства обороны РФ и МЧС, действующих в чрезвычайных ситуациях [1].

ВЧЖ представляет собой лиофилизированную живую культуру вакцинного штамма чумного микроба *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ. После вакцинации у большинства привитых формируется напряжённый иммунитет продолжительностью 6–12 мес, качество и длительность которого зависят от возраста, количества предыдущих вакци-

наций против этой инфекции и индивидуальных особенностей генетического полиморфизма генов HLA [2]. Многолетний опыт применения ВЧЖ свидетельствует о необходимости совершенствования подходов к специфической профилактике чумы для создания эффективного иммунитета у каждого прививаемого человека.

Если при разработке субъединичных вакцин применение иммуномодуляторов и адъювантов решает задачу оптимального представления антигенов иммунной системе, способствуя формированию выраженного иммунного ответа с активацией как гуморальных, так и клеточных реакций [3], то в исследованиях по сочетанному введению вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ с азоксимером бромида (полиоксидоний) [4], синтетическим аналогом лей-энкефалина (даларгин) и синтетическим аналогом двуспиральной РНК (лиганда TLR3) — (Poly(I:C)) [5], рекомбинантным человеческим интерфероном- $\gamma$  (ИФН- $\gamma$ ) (ингарон) [6], рекомбинантным интерлейкином-1Р (беталейкин) [7] не только получен стимулирующий эффект вакцинации, но и определены точки возможного воздействия на иммунную систему в различные периоды иммуногенеза.

Однако выбор иммуномодулятора не должен быть эмпирическим. В выборе препарата для потенцирования действия вакцины важно учитывать механизм и направленность действия иммуномодулятора на те или иные звенья иммунной системы [8]. В зависимости от происхождения иммуномодуляторы делят на микробные, растительные, человеческие (эндогенные), аналоги природных соединений, полученные путём химического синтеза или с помощью рекомбинантных технологий, и синтетические иммуномодуляторы [9]. Прогресс в области лекарственных средств тимического происхождения шёл по линии создания препаратов II и III поколений — синтетических аналогов природных гормонов тимуса или фрагментов этих гормонов, обладающих биоактивностью. На основе одного из фрагментов, включающего аминокислотные остатки активного центра тимопоэтина, был создан синтетический гексапептид аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинин (имунофан), обладающий выраженными иммуностимулирующими свойствами [9, 10]. К классу тиопоэтинов из группы химически чистых синтетических низкомолекулярных иммуномодуляторов относится синтетический олигопептид глутаксим — глутамил-цистеинил-глицин динатрия, усиливающий костномозговое кровяное образование, активирующий фагоцитоз, восстанавливающий функциональную активность макрофагов, инициирующий систему цитокинов, эритропоэтина [11, 12]. Другой низкомолекулярный олигопептид — гепон состоит из 14 аминокислот (Thr-Glu-Lys-Lys-Arg-Arg-Glu-Thr-Val-Glu-Arg-Glu-

Lys-Glu) и вызывает продукцию  $\alpha$ - и  $\beta$ -ИФН; мобилизует и активирует макрофаги, стимулирует клеточный и гуморальный иммунитет [9, 13]. И хотя все эти препараты характеризует сходный механизм воздействия на иммунную систему макроорганизма, требует уточнения направленность иммуномодулирующего влияния данных синтетических олигопептидов в условиях сочетанного применения с вакцинным штаммом *Y. pestis* EV линии НИИЭГ.

**Цель** исследования — сравнительная оценка действия лекарственных препаратов из группы синтетических иммуномодуляторов на иммуногенные и протективные свойства вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ в модельных опытах на животных.

## Материалы и методы

### Штаммы

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

### Иммуномодулирующие препараты

Олигопептид 1 — О1 (треонил-глутамил-лизил-лизил-аргинил-аргинил-глутамил-треонил-валил-глутамил-аргинил-глутамил-лизил-глутамат; глутоксим), олигопептид 2 — О2 (глутамил-цистеинил-глицин динатрия; гепон) и олигопептид 3 — О3 (аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинин; имунофан), все препараты российского производства. Дозы препаратов (**табл. 1**) были выбраны с учётом данных литературы и на основании предварительных результатов собственных исследований.

### Лабораторные животные

Эксперименты проводили на беспородных белых мышах массой  $17,5 \pm 2,5$  г и на морских свинках массой  $275 \pm 25$  г, полученных из питомника РосНИПЧИ «Микроб». Манипуляции с животными, а также выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с законодательством Российской Федерации [14] и Директивой № 2010/63/ЕС Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 «О защите животных, использующихся для научных целей» [15]. Протокол исследований одобрен Комиссией по биоэтике при РосНИПЧИ «Микроб» (протоколы № 6 от 14.04.2021, № 11 от 07.12.2021, № 2 от 17.02.2022).

### Питательные среды

Культуры штаммов выращивали на агаре Хоттингера pH  $7,2 \pm 0,1$  (производство РосНИПЧИ «Микроб»).

**Таблица 1.** Препараты, использованные для иммунизации биопробных животных**Table 1.** Preparations used for immunization of biomodel animals

Препарат, использованный для иммунизации The preparation used for immunization	Иммунизация беспородных белых мышей Immunization of outbred white mice		Иммунизация беспородных морских свинок Immunization of outbred guinea pigs	
	доза, мкг   dose, µg	<i>n</i>	доза, мкг   dose, µg	<i>n</i>
O1	10	40* + 80** + 40***	100	12* + 15**
O2	30	40* + 80** + 40***	300	14* + 15**
O3	1	40* + 80** + 40***	10	12* + 15**

**Примечание.** \* — животные, иммунизированные однократно; \*\* — животные, иммунизированные трёхкратно; \*\*\* — животные, использованные для определения значения ЛД<sub>50</sub>.

**Note.** \* — animals immunized once; \*\* — animals immunized three times; \*\*\* — animals used to determine the LD<sub>50</sub>.

### Оценка иммуногенности и протективности

Оценку влияния иммуномодулирующих препаратов на показатели иммуногенности и протективности вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ проводили в соответствии с МУ 3.3.1.1113-02 «Основные требования к вакцинным штаммам чумного микроба» [16]. Рассчитывали иммунизирующую дозу (ImD<sub>50</sub>), защищающую 50% вакцинированных животных от летального заражения вирулентным штаммом *Y. pestis* 231(708) на 21-е сутки после вакцинации.

Для этого беспородных белых мышей (по 10 особей на каждую иммунизирующую дозу) иммунизировали 2-суточной агаровой культурой вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ подкожно в дозах  $2 \times 10^2$ ,  $10^3$ ,  $5 \times 10^3$  и  $2,5 \times 10^4$  КОЕ в объёме 0,2 мл. Животным опытных групп за 1 ч до вакцинации (1-я схема) и трёхкратно до заражения (2-я схема) подкожно вводили олигопептиды 1, 2 и 3 в дозах 10, 30 и 1 мкг соответственно. Морских свинок иммунизировали подкожно в область верхней трети правого бедра 2-суточной агаровой культурой *Y. pestis* EV линии НИИЭГ в дозах  $4 \times 10^1$ ,  $2 \times 10^2$ ,  $10^3$ ,  $5 \times 10^3$  КОЕ в объёме 0,5 мл. Животным опытных групп за 1 ч до вакцинации (1 схема) и трёхкратно до заражения (2 схема) подкожно вводили олигопептиды 1, 2 и 3. На 21-е сутки после иммунизации всех животных заражали культурой вирулентного штамма основного подвида *Y. pestis* 231(708) в дозе 400 ЛД<sub>50</sub> подкожно в область верхней трети левого бедра.

Для определения значения ЛД<sub>50</sub> заражающего штамма *Y. pestis* 231(708) интактных беспородных белых мышей подкожно заражали тест-штаммом *Y. pestis* 231(708) в пятикратно возрастающей концентрации от 1 до 125 КОЕ. Наблюдение за животными осуществляли в течение 20 сут. Гибель от чумы подтверждали наличием характерных для чумной инфекции патолого-анатомических изменений, чумного микроба в окрашенных по Граму мазках — отпечатках органов павших животных, положительного результата высевов из органов и крови на пластинки агара Хоттингера pH 7,2 ±

0,1, содержащие стимулятор роста сульфит натрия ( $0,024 \pm 0,001\%$ ) и генцианвиолет ( $0,0045 \pm 0,0005\%$ ).

### Цитокиновый профиль

Определение уровня продукции цитокинов проводили на 3, 14 и 21-е сутки иммуногенеза с помощью твёрдофазного иммуноферментного анализа с применением коммерческих тест-систем («BioScience») на автоматическом иммуноферментном анализаторе «Lazurit» («Dynex Technologies») при длине волны 450 нм. Для оценки продукции цитокинов ИФН-γ и интерлейкина-10 (ИЛ-10) венозную кровь с антикоагулянтом (гепарин, ОАО «Синтез») разводили в соотношении 1 : 4 средой RPMI-1640 («PanEco»), содержащей 100 мкг/мл гентамицина («Мосхимфармпрепараты им. Н.А. Семашко»), затем делили на 2 равные части. В одну часть вносили 100 мкл Т-клеточного митогена конканавалина А («Sigma») в конечной концентрации 15 мкг/мл (индуцированная продукция), в другую — 100 мкл физиологического раствора (спонтанная продукция). Образцы инкубировали в течение 24 ч при 37°C [17]. После инкубации клетки осаждали центрифугированием в стандартных условиях и отбирали супернатанты.

### Выявление специфических антител

Специфические антитела к капсульному антигену чумного микроба (F1) определяли в сыворотке крови экспериментальных животных на 21-е сутки иммуногенеза методом твёрдофазного иммуноферментного анализа с использованием коммерческой тест-системы «ИФА-АТ-Ф1 *Yersinia pestis*» (РосНИПЧИ «Микроб»). Активность антител в сыворотке определяли в 3 повторах и выражали в виде обратного среднегеометрического титра и его средней квадратической ошибки.

### Морфологические исследования

Макроскопические изменения у умерщвлённых хлороформом животных описывали по стандартной схеме, учитывая характер и объём повреждения во внутренних органах. Для гистологического

исследования в 10% водный нейтральный раствор формалина забирали кусочки внутренних органов (печень, почки, селезёнка, тимус, лимфатические узлы, надпочечники, сердце, лёгкие). Из фиксированного материала, применяя стандартную схему проводки гистологического материала, готовили парафиновые блоки. Готовые полутонкие срезы органов, окрашенные гематоксилином и эозином, просматривали в световом микроскопе «Olympus CX41» («Olympus»), фиксируя результат с помощью цифровой камеры «VZ-C31S» («VideoZavr») в программе «VideoZavr v. 1.5».

### Статистические методы

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием стандартного пакета программ «Microsoft Office Excel 2010» и «Statistica 10.0» («StatSoft Inc.»). Взаимосвязь между переменными определяли с помощью рангового корреляционного анализа по Спирмену. Данные представляли в виде  $M \pm m$ , где  $M$  — среднее значение,  $m$  — средняя квадратическая ошибка средней арифметической. Достоверность различий сравниваемых величин оценивали с помощью парного  $t$ -критерия Стьюдента. Корреляцию считали достоверной при  $p \leq 0,05$ . Величины  $ImD_{50}$  и  $LD_{50}$  рассчитывали по методу Кербера в модификации И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева [18].

### Результаты

На первом этапе проводили расчёт  $LD_{50}$  заражающего вирулентного штамма основного подвида *Y. pestis* 231(708) и оценку влияния иммуномодуляторов O1, O2 и O3 на изменение показателя  $LD_{50}$  заражающего вирулентного штамма основного

подвида *Y. pestis* 231(708). Невакцинированным животным перед заражением трёхкратно подкожно вводили иммуномодуляторы. Если для интактных белых мышей  $LD_{50}$  штамма *Y. pestis* 231(708) составила 5 (4–6) КОЕ, то в группе животных, которым перед заражением трёхкратно подкожно был введён иммуномодулятор O1, — 16 (13–18) КОЕ, т.е. был в 3 раза выше, чем у неиммунизированных животных (рис. 1, а), и коррелировал с увеличением средней продолжительности жизни у павших животных этой группы в среднем на 36 ч (рис. 1, б). Применение иммуномодуляторов O2 и O3 в аналогичной схеме существенно не влияло на развитие чумной инфекции у биомодели и не изменяло значение  $LD_{50}$  заражающего штамма.

### Действие олигопептидных иммуномодуляторов в условиях моделирования бубонной формы чумы

Далее была осуществлена оценка эффективности применения лекарственных средств, относящихся к группе низкомолекулярных олигопептидов, при экспериментальной чуме у разных видов лабораторных животных (беспородные белые мыши, морские свинки), ранее иммунизированных вакцинным штаммом EV, по интегральному показателю  $ImD_{50}$  и выживаемости. Нами установлено, что иммунизация экспериментальных животных вакцинным штаммом чумного микроба *Y. pestis* EV линии НИИЭГ на фоне введения исследуемых препаратов приводит к повышению напряжённости адаптивного противочумного иммунитета. Существенные отличия в полученных данных обусловлены разницей во времени и кратности введения иммуномодуляторов (табл. 2). Однократное введение выбранных

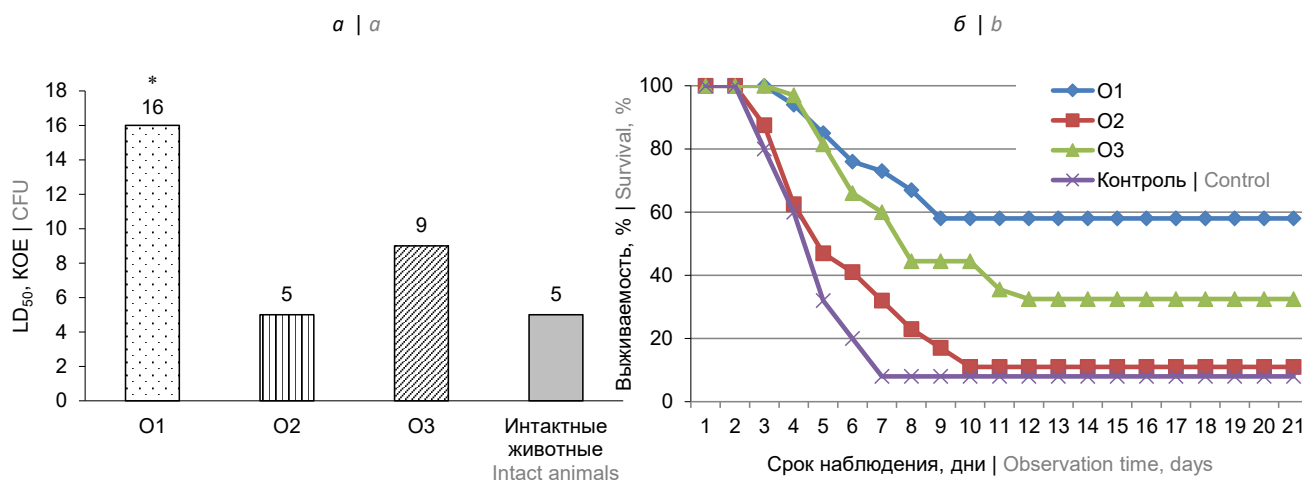


Рис. 1. Влияние олигопептидов O1, O2, O3 на значение  $LD_{50}$  (а) и продолжительность жизни белых мышей (б) в условиях подкожного заражения вирулентным штаммом *Y. pestis* 231(708).

\* $p < 0,05$  по сравнению с неиммунизированными животными.

Fig. 1. Influence of oligopeptides O1, O2, O3 on the  $LD_{50}$  (a) and on the survival of white mice (b) under conditions of subcutaneous infection with the virulent strain *Y. pestis* 231(708).

\* $p < 0.05$  when compared with intact animals.

**Таблица 2.** Влияние олигопептидных препаратов O1, O2, O3 при однократном и трёхкратном введении на защитное действие вакцинного штамма чумного микроба *Y. pestis* EV линии НИИЭГ при заражении белых мышей 400 LD<sub>50</sub> *Y. pestis* 231 ( $M \pm m$ )

**Table 2.** Influence of oligopeptide preparations O1, O2, O3 with single and triple administration on the protective efficacy of vaccine strain *Y. pestis* EV line NIIEG at lethal challenge white mice with 400 LD<sub>50</sub> *Y. pestis* strain 231 ( $M \pm m$ )

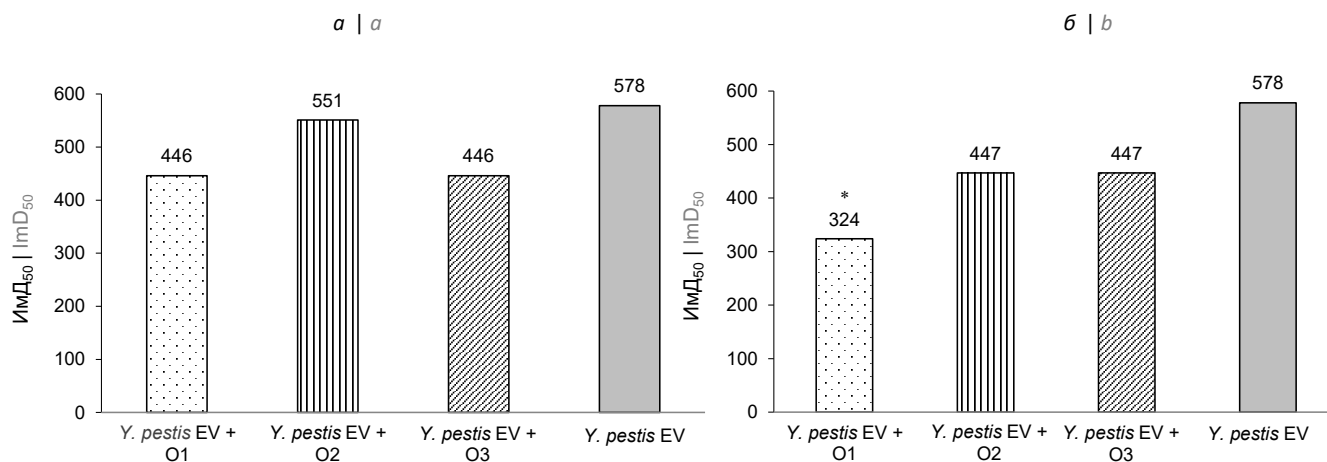
Доза иммунизирующего препарата <i>Y. pestis</i> EV линии НИИЭГ, КОЕ Immunization strain <i>Y. pestis</i> EV line NIIEG dose, CFU	Число выживших животных/общее количество Number of animals (survived/inoculated)		Средняя продолжительность жизни, сут Mean time-to-death, days		ImD <sub>50</sub> КОЕ ImD <sub>50</sub> CFU	
	схема 1 scheme 1	схема 2 scheme 2	схема 1 scheme 1	схема 2 scheme 2	схема 1 scheme 1	схема 2 scheme 2
5,0 × 10 <sup>3</sup>	4/10	4/10	4,3 ± 0,1	4,4 ± 0,2	6876	1824
2,5 × 10 <sup>4</sup>	5/10	6/10	5,8 ± 0,6*	5,4 ± 0,1*		
5,0 × 10 <sup>3</sup> + O1	4/10	8/10	4,4 ± 0,8	5,5 ± 0,4*	5860	1492
2,5 × 10 <sup>4</sup> + O1	6/10	8/10	4,9 ± 0,6*	6,4 ± 0,8*		
5,0 × 10 <sup>3</sup> + O2	5/10	8/10	4,8 ± 0,1*	6,9 ± 0,4*	5860	1492
2,5 × 10 <sup>4</sup> + O2	5/10	7/10	5,8 ± 0,3*	7,5 ± 0,3 <sup>#</sup>		
5,0 × 10 <sup>3</sup> + O3	5/10	6/8	4,8 ± 0,3	6,8 ± 0,4*	6454	816
2,5 × 10 <sup>4</sup> + O3	4/9	7/10	5,6 ± 0,2*	7,1 ± 0,4 <sup>#</sup>		
Физиологический раствор PBS	0/10		3,5 ± 0,5		—	

**Примечание.** \* $p < 0,05$  по сравнению с неиммунизированными животными; <sup>#</sup> $p < 0,05$  по сравнению с животными, иммунизированными только *Y. pestis* EV линии НИИЭГ.

**Note.** \* $p < 0.05$  when compared with intact animals; <sup>#</sup> $p < 0.05$  when compared with animals immunized with only *Y. pestis* line EV NIIEG.

олигопептидов совместно с вакцинным штаммом оказывало минимальное влияние на эффективность защиты животных от чумы. Трёхкратное введение препаратов перед заражением приводило к снижению показателей ImD<sub>50</sub> *Y. pestis* EV линии НИИЭГ на фоне применения O1 и O2 в 1,2 раза, O3 — в 2,2 раза по сравнению с животными, иммунизированными только вакцинным штаммом. Средняя продолжительность жизни павших биопробных животных увеличилась в среднем на 1 сут.

Изучение действия олигопептидных иммуномодуляторов на протективные свойства вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ повторили на морских свинках как на более адекватной модели чумной инфекции [19]. У иммунизированных иммуномодуляторами по тем же схемам морским свинкам регистрировали снижение ImD<sub>50</sub> по сравнению с морскими свинками, иммунизированными только вакцинным штаммом EV. Однако изменение протективности в ответ на применение иммуномо-



**Рис. 2.** Значение ImD<sub>50</sub> для штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ на фоне введения олигопептидов O1, O2, O3 по схеме 1 (а) и схеме 2 (б) перед заражением морских свинок 400 LD<sub>50</sub> *Y. pestis* 231.

\* $p < 0,05$  при сравнении с вакцинированными только *Y. pestis* EV линии НИИЭГ.

**Fig. 2.** The mean ImD<sub>50</sub> values of *Y. pestis* strain EV line NIIEG in treatment groups with oligopeptides O1, O2, O3 according to scheme 1 (2a) and scheme 2 (2b) before lethal challenge of guinea pigs with 400 LD<sub>50</sub> *Y. pestis* strain 231.

\* $p < 0.05$  in comparison with vaccinated mice only *Y. pestis* EV line NIIEG.

дуляторов у этой биомодели было менее выраженным, чем у белых мышей (рис. 2). Максимальное снижение показателя отмечали на сочетанное применение О1 по схеме 2 — в 1,8 раза.

Кроме того было зафиксировано достоверное ( $p < 0,05$ ) увеличение инкубационного периода и средней продолжительности жизни животных. Наиболее выраженные изменения продолжительности жизни павших морских свинок по сравнению с контрольной группой животных отмечались при применении О2 — в 1,7 раза (до 8 сут) и О1 — в 2,3 раза (до 11 сут).

#### Влияние олигопептидных иммуномодуляторов на иммуногенные свойства *Y. pestis* линии EV НИИЭГ

У всех иммунизированных белых мышей выявляли антитела к F1 чумного микроба (табл. 3). Сочетанная вакцинация *Y. pestis* EV линии НИИЭГ с О1 приводила к наиболее значимому повышению титров антител к капсульному антигену чумного микроба по сравнению с группами биопробных

животных, иммунизированных только вакцинным штаммом *Y. pestis* EV линии НИИЭГ. Напротив, О3 при совместном введении с вакцинным штаммом EV вызывал снижение титров детектируемых антител. Включение О2 в схему иммунизации мышей вакцинным штаммом *Y. pestis* EV линии НИИЭГ существенно не влияло на выработку антител к F1 чумного микроба. Исследование уровня специфических антител у морских свинок показало, что введение иммуномодулирующих препаратов не давало достоверно значимого изменения уровня антител. Обратные значения среднегеометрического титра у иммунизированных О1 и О2 животных составляли  $1500 \pm 406$ , а на введение О3 даже зарегистрировано некоторое снижение титров антител к F1 чумного микроба — 1 на  $1213,3 \pm 60,3$  ( $p < 0,1$ ).

Уровни цитокинов в сыворотке крови мышей определяли в опытах *in vivo* через 3, 14 и 21 сут после трёхкратной иммунизации препаратами олигопептидов. Из анализа представленных в табл. 3 данных видно, что иммунизация мышей препара-

**Таблица 3.** Динамика продукции цитокинов и антител к F1 *Y. pestis* при введении иммуномодулирующих препаратов у иммунизированных белых мышей Me ( $Q_1-Q_3$ )

**Table 3.** Dynamics of cytokine production and antibodies to F1 *Y. pestis* following the administration of immunomodulatory preparations in immunized white mice Me ( $Q_1-Q_3$ )

Группа Group (n = 30)	Срок, сут Duration of the study, day	ИФН- $\gamma$ , пг/мл, Me ( $Q_1-Q_3$ ) INF- $\gamma$ , pg/ml, Me ( $Q_1-Q_3$ )		ИЛ-10, пг/мл, Me ( $Q_1-Q_3$ ) IL-10, pg/ml, Me ( $Q_1-Q_3$ )		Обратные значения среднегеометрического титра ( $M \pm m$ ) Geometric mean reciprocal titers to F1 <i>Y. pestis</i> protein ( $M \pm m$ )
		Sp	Ind	Sp	Ind	
<i>Y. pestis</i> EV линии НИИЭГ ( $2,5 \times 10^4$ КОЕ) <i>Y. pestis</i> EV line NIIEG ( $2,5 \times 10^4$ CFU)	3	28,2 (21,3–35,2)	57,1 (53,3–63,6)	11,2 (8,8–11,5)	15,4 (11,8–16,2)	–
	14	22,2 (15,7–29,9)	40,6 (37,6–60,6)	12,2 (7,2–15,5)	16,9 (9,9–20,7)	–
	21	20,3 (13,7–27,9)	42,6 (23,5–54,7)	14,2 (9,8–17,2)	17,9 (11,1–22,3)	512 $\pm$ 35,43
<i>Y. pestis</i> EV линии НИИЭГ ( $2,5 \times 10^4$ КОЕ + О1) <i>Y. pestis</i> EV line NIIEG ( $2,5 \times 10^4$ CFU + О1)	3	39,1 (31,6–54,7)	67,9 (39,3–77,4)	29,5* (20,8–40,4)	38,2* (23,9–52,4)	–
	14	38,2 (26,2–50,6)	62,1 (42,1–83,9)	20,33 (14,4–26,7)	25,5* (14,0–54,7)	–
	21	20,2 (12,2–38,7)	66,7 (40,5–87,0)	11,1 (4,4–23,1)	25,6* (18,9–44,0)	873 $\pm$ 84,4*
<i>Y. pestis</i> EV линии НИИЭГ ( $2,5 \times 10^4$ КОЕ + О2) <i>Y. pestis</i> EV line NIIEG ( $2,5 \times 10^4$ CFU+ О2)	3	37,9 (26,4–49,6)	68,2 (65,3–69,8)	19,2 (18,9–22,8)	24,3 (11,5–30,4)	–
	14	34,1 (28,5–50,5)	67,7 (55,6–73,9)	19,1 (11,7–25,3)	24,2 (19,7–34,2)	–
	21	28,1 (22,8–31,6)	51,7 (46,7–66,8)	14,5 (8,6–23,3)	19,4 (8,6–36,8)	512 $\pm$ 40,4
<i>Y. pestis</i> EV линии НИИЭГ ( $2,5 \times 10^4$ КОЕ + О3) <i>Y. pestis</i> EV line NIIEG ( $2,5 \times 10^4$ CFU+ О3)	3	42,6* (23,5–54,7)	102,1* (82,1–113,9)	30,33* (24,4–36,7)	45,5* (34,0–64,7)	–
	14	30,2 (29,4–31,7)	75,5* (69,2–79,3)	20,1 (14,9–23,1)	34,3* (29,1–40,7)	–
	21	27,1 (20,2–34,1)	62,5 (59,5–71,0)	17,7 (14,0–19,8)	22,9 (19,6–24,7)	324 $\pm$ 25,9

**Примечание.** Sp — спонтанная продукция; Ind — индуцированная продукция; \* $p < 0,05$  по сравнению с группой, иммунизированной только *Y. pestis* EV линии НИИЭГ ( $2,5 \times 10^4$  КОЕ).

**Note.** Sp — spontaneous production; Ind — induced production; \* $p < 0.05$  compared to to group immunized only by *Y. pestis* EV line NIIEG ( $2.5 \times 10^4$  CFU).

том O1 приводила к незначительному повышению как спонтанной, так и индуцированной продукции ИФН- $\gamma$  по сравнению с контрольной группой животных, иммунизированных только *Y. pestis* EV линии НИИЭГ. Через 3 сут после иммунизации данным иммуномодулятором наблюдали повышенный синтез противовоспалительного цитокина ИЛ-10, что коррелировало с повышением титра противочумных антител к F1 чумного микроба и может свидетельствовать об активации как клеточного, так и гуморального иммунного ответа. Иммунизация препаратом O3 на 3-и сутки вызывала однократную выработку высоких концентраций провоспалительного цитокина ИФН- $\gamma$ , индуцирующего клеточный иммунный ответ. Далее на 14-е сутки концентрация ИФН- $\gamma$  падала, и через 21 сут различий в продукции цитокинов с контрольной группой не выявляли. Введение O2 приводило к незначительному ( $p < 0,5$ ) повышению продукции ИФН- $\gamma$  и ИЛ-10 в начальные сроки после иммунизации. Затем уровень продукции цитокинов — как спонтанной, так и индуцированной — снижался до уровней контрольной группы.

При морфологическом исследовании органов морских свинок, иммунизированных *Y. pestis* EV линии НИИЭГ в дозе  $5 \times 10^3$  совместно с олигопептидами O1, O2 и O3, не выявлено грубых изменений со стороны внутренних органов. При гистологическом исследовании на фоне отсутствия признаков повреждения тканей регистрировали умеренные гиперпластические процессы в лимфоидных органах. Значимых морфологических отличий, связанных с введением исследуемых олигопептидов, у животных не наблюдали.

## Обсуждение

Применяемая для специфической профилактики чумы ВЧЖ, лицензированная в России, снижает заболеваемость и обеспечивает более лёгкое течение болезни, но недостаточно эффективна в отношении лёгочной чумы и вызывает непродолжительный напряжённый иммунитет. Многолетнее комплексное иммунологическое исследование вакцинированных ВЧЖ лиц декретируемых контингентов показало индивидуальную иммунологическую эффективность вакцины, зависящую от многих факторов [2, 20]. Применение иммуномодуляторов на фоне прививки ВЧЖ — одно из реальных и перспективных направлений повышения эффективности противочумного иммунитета. Учитывая, в первую очередь, механизм действия, а также положительные результаты, полученные при использовании иммуномодулирующих препаратов в схемах лечения и профилактики как вирусных, так и бактериальных инфекций, были отобраны иммуномодуляторы, использование которых может быть эффективным для совершенствования специфической профилактики чумы.

Препарат O1, регулирующий окислительно-восстановительные процессы, обладающий иммуностимулирующим, гепатопротективным, гемопотетическим потенциалом, в наших исследованиях повышал выживаемость животных, возможно, активируя тканевые макрофаги и способствуя поглощению и гибели микроорганизмов. В данной серии экспериментов пептид показал наилучшие результаты: у интактных белых мышей при трёхкратном введении O1 регистрировали повышение показателя ЛД<sub>50</sub> штамма *Y. pestis* 231(708) в 3 раза по сравнению с контрольной группой, что коррелировало с увеличением средней продолжительности жизни павших животных опытной группы. Также при трёхкратном введении препарата O1 отмечали снижение интегрального показателя ImD<sub>50</sub> у белых мышей — в 1,2 раза, у морских свинок — в 1,8 раза по сравнению с контрольной группой животных, иммунизированных только *Y. pestis* EV линии НИИЭГ, что указывает на активацию протективных свойств вакцины. Повышение выживаемости животных после заражения сопровождалось ростом средней продолжительности жизни павших биомоделей (в 1,2–2,3 раза). Пептид O1 стимулировал увеличение антителопродукции, что коррелировало с ростом противовоспалительного цитокина ИЛ-10. Аналогичные результаты, сопровождающиеся повышением защитного эффекта вакцинации, получены при введении с живой бруцеллезной вакциной иммуномодуляторов ликопида и тимогена [21], а также при изучении влияния азоксимера бромида на иммуногенные и протективные свойства вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ при экспериментальной чуме [3, 4].

Синтетический пептид O2 мобилизует и активирует клетки моноцитарно-макрофагального ряда, индукцию синтеза ИФН- $\alpha$  и - $\beta$ , стимулирует синтез антител к различным антигенам инфекционной природы, а также влияет на содержание CD4 T- и NK-клеток в периферической крови [9, 13]. У животных, иммунизированных вакцинным штаммом чумы, трёхкратное введение O2 непосредственно перед заражением *Y. pestis* 231(708) в 1,4–2,1 раза увеличивало среднюю продолжительность жизни биомодели и пролонгировало период до манифестации заболевания, что позволяет рассматривать этот препарат особенно перспективным для экстренной профилактики чумы. Известно, что в случае чумы дополнительные 24 ч на принятие решения о назначении этиотропной терапии пациенту позволяют минимум на 50% повысить шансы на выздоровление [22].

Синтетический иммуномодулятор тимического происхождения O3 активирует поглощение лейкоцитами бактерий и их переваривание, стимулирует образование всех видов иммуноглобулинов, усиливая продукцию ИЛ-2 лимфоцитами [9, 10]. В нашем исследовании установлено потенцирующее



щее влияние ОЗ на иммуногенную и протективную активность вакцинного штамма чумного микроба при моделировании бубонной формы чумы на двух видах экспериментальных животных. Так, трёхкратное введение иммуномодулятора ОЗ перед заражением вызывало значимое снижение интегрального показателя  $ImD_{50}$  у белых мышей и морских свинок. Интересен установленный факт увеличения продукции цитокинов у иммунизированных по данной схеме животных, что сопровождалось повышением напряжённости противочумного иммунитета, происходящим даже на фоне снижения титров детектируемых антител к капсульному антигену F1 чумного микроба у белых мышей и морских свинок. Возможно, что активированные введением ОЗ цитокины участвуют в механизме ингибирования высвобождения В-клетками синтезируемых иммуноглобулинов и в перестройке иммунной системы биомоделей на клеточный тип иммунного ответа.

Отдельно необходимо отметить отсутствие при совместном введении со штаммом *Y. pestis* EV линии НИИЭГ негативного влияния олигопептидных препаратов на ткани и органы вакцинированных биомоделей, установленное с помощью морфогистологического исследования.

### Заключение

Результаты комплексной оценки возможности повышения иммуногенности и протективности вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ за счёт использования различных схем применения синтетических олигопептидных иммуномодуляторов показали, что оптимальным препаратом, обеспечивающим стимуляцию клеточного звена иммунитета, повышающим иммуногенность и протективный эффект живой чумной вакцины, является глутоксим (O1). Несмотря на то что гепон (O2) положительно влиял на показатели клеточного иммунитета при сочетанном введении с *Y. pestis* EV линии НИИЭГ, ожидаемого повышения защитного эффекта в опытах на белых мышах и морских свинках обнаружено не было. Применение иммунофана (O3) совместно с вакцинным штаммом в сравнении с другими анализируемыми препаратами показало преимущественное избирательное влияние на Т-клеточное звено иммунитета, что и следовало с большей вероятностью ожидать от синтетического аналога тимопэтина. Не стоит забывать при работе с иммуномодуляторами, что повышение защитного эффекта иммунизации на фоне применения олигопептидов чётко зависело от выбранного типа биомодели: для белых мышей снижение  $ImD_{50}$  было более значимым, чем для морских свинок.

Таким образом, исследования по отбору и оценке эффективности иммуномодулирующих препаратов для включения в схему вакцинации против чумы открывают новые возможности фор-

мирования основы для совершенствования специфической профилактики этой инфекции в условиях многолетнего обострения эпизоотической активности на территориях природных очагов инфекции или при угрозе возникновения эпидемических осложнений.

### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Дятлов И.А., Анисимов А.П., Храмов М.В., Дунайцев И.А., Ажермачева Н.И., Сомов А.Н. Вакцина чумная молекулярная микроинкапсулированная (ВЧММ). *Бактериология*. 2018; 3(1): 74–5.
2. Кудрявцева О.М., Гончарова А.Ю., Бугоркова С.А., Кожевников В.А., Щуковская Т.Н., Каштанова Т.Н. и др. Анализ факторов, влияющих на иммунологическую реактивность лиц, вакцинированных живой чумной вакциной. *Здоровье населения и среда обитания*. 2020; (6): 17–24. <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2020-327-6-17-24>
3. Микшиш Н.И., Кутырев В.В. Современное состояние проблемы разработки вакцин для специфической профилактики чумы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; (1): 50–63. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2019-1-50-63>
4. Каральник Б.В., Пономарева Т.С., Дерябин П.Н., Денисова Т.Т., Мельникова Н.Н., Тугамбаев Т.И. и др. Влияние иммуномодуляции на иммуногенную и протективную активность живой чумной вакцины. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2014; 91(6): 108–12.
5. Щуковская Т.Н., Курьлина А.Ф., Шавина Н.Ю., Бугоркова С.А. Влияние полиоксидония, Poly(I:C), даларгина на защитное действие вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ при экспериментальной чуме. *Российский иммунологический журнал*. 2020; 23(1): 41–50. <https://doi.org/10.46235/1028-7221-005-IOP>
6. Гончарова А.Ю., Бугоркова С.А., Кудрявцева О.М., Кожевников В.А., Кравцов А.Л., Каштанова Т.Н. и др. Экспериментальная оценка эффективности применения вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ в сочетании с иммуномодуляторами. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; (2): 71–7. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-2-71-77>
7. Пономарева Т.С., Дерябин П.Н., Каральник Б.В., Денисова Т.Т., Тугамбаев Т.И., Атшабар Б.Б. и др. Влияние бета-лейкина на показатели антиген-специфического иммунного ответа в модельных опытах иммунизации животных живой противочумной вакциной. *Цитокины и воспаление*. 2014; 13(1): 57–62.
8. Хайтов Р.М. Иммуномодуляторы: мифы и реальность. *Иммунология*. 2020; (2): 1–6. <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-2-101-106>
9. Хайтов Р.М., Атауллаханов Р.И., Шульженко А.Е. Иммуно-терапия: руководство для врачей. М.: ГЭОТАРМедиа; 2018.
10. Лебедев В.В. Иммунофан – синтетический пептидный препарат нового поколения: иммунологические и патогенетические аспекты клинического применения. *Иммунология*. 1999; (1): 25–30.
11. Townsend D.M., He L., Hutchens S., Garrett T.E., Pazoles C.J., Tew K.D. NOV-002, a glutathione disulfide mimetic, as a modulator of cellular redox balance. *Cancer Res*. 2008; 68(8): 2870–7. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-07-5957>
12. Антушевич А.А., Антонов В.Г., Гребенюк А.Н., Антушевич А.Е., Ладанова Т.В., Бурова Е.Б. Патогизиологические основы эффективности глутоксима как средства сопровождения лучевой терапии рака ротоглотки. *Вестник Российской военно-медицинской академии*. 2013; (3): 32–7.
13. Атауллаханов Р.И., Катлинский А.В., Холмс Р.Д., Мастернак Т.Б., Ларин А.С., Малкина Е.Ю. и др. Усиление обра-

- зования антител под влиянием иммуномодулятора Гефона. *Иммунология*. 2003; (1): 9–12.
14. Приказ Минздравсоцразвития России № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики»; 2010.
  15. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях. СПб.; 2010.
  16. МУ 3.3.1.1113-02. Основные требования к вакцинным штаммам чумного микроба: методические указания. М.; 2002.
  17. Клюева С.Н., Шуковская Т.Н. Влияние адъювантов нового поколения *in vitro* на продукцию цитокинов клетками крови вакцинированных против чумы лиц. *Российский иммунологический журнал*. 2015; 9(2): 201–8.
  18. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Ленинград: Медгиз; 1962.
  19. Quenee L.E., Ciletti N., Berube B., Krausz T., Elli D., Hermans T., et al. Plague in Guinea pigs and its prevention by subunit vaccines. *Am. J. Pathol.* 2011; 178(4): 1689–700. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.12.028>
  20. Бугоркова С.А., Шуковская Т.Н., Микшис Н.И., Клюева С.Н., Кудрявцева О.М., Кравцов А.Л. и др. Комплексное иммунологическое исследование вакцинированных живой чумной вакциной лиц, проживающих на территории прикаспийского песчанного очага чумы в республике Калмыкия. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2018; 17(3): 38–50. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-3-38-50>
  21. Богачева Н.В., Охачкина В.Ю., Пяткова Н.В., Федотов А.К., Кучеренко А.С. Экспериментальное изучение влияния иммуномодуляторов на эффективность применения вакцины бруцеллезной живой сухой. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2016; 15(2): 84–92.
  22. Andersson J.A., Sha J., Kirtley M.L., Reyes E., Fitts E.C., Dann S.M., et al. Combating multidrug-resistant pathogens with host-directed nonantibiotic therapeutics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2017; 62(1): 01943–17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01943-17>
- REFERENCES
1. Dyatlov I.A., Anisimov A.P., Khranov M.V., Dunaytsev I.A., Azhermacheva N.I., Somov A.N., et al. Molecular micro-encapsulated plague vaccine (MMPV). *Bakteriologiya*. 2018; 3(1): 74–5. (in Russian)
  2. Kudryavtseva O.M., Goncharova A.Yu., Bugorkova S.A., Kozhevnikov V.A., Shchukovskaya T.N., Kashtanova T.N., et al. The analysis of factors influencing immunologic reactivity in people vaccinated with a live plague vaccine. *Zdorov'e naseledeniya i sreda obitaniya*. 2020; (6): 17–24. <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2020-327-6-17-24> (in Russian)
  3. Mikshis N.I., Kutryev V.V. Current state of the problem of vaccine development for specific prophylaxis of plague. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2019; (1): 50–63. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2019-1-50-63> (in Russian)
  4. Karal'nik B.V., Ponomareva T.S., Deryabin P.N., Denisova T.T., Mel'nikova N.N., Tugambaev T.I., et al. Effect of immune modulation on immunogenic and protective activity of a live plague vaccine. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2014; 91(6): 108–12. (in Russian)
  5. Shchukovskaya T.N., Kurylina A.F., Shavina N.Yu., Bugorkova S.A. Influence of polyoxidonium, poly(i:c), dalargin on the protective efficacy of yersinia pestis vaccine strain ev line niieg in experimental plague. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal*. 2020; 23(1): 41–50. <https://doi.org/10.46235/1028-7221-005-IOP> (in Russian)
  6. Goncharova A.Yu., Bugorkova S.A., Kudryavtseva O.M., Kozhevnikov V.A., Kravtsov A.L., Kashtanova T.N., et al. Experimental evaluation of application of the vaccine strain *Yersinia pestis* EV NIIEG in combination with immune-modulators. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2020; (2): 71–7. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-2-71-77> (in Russian)
  7. Ponomareva T.S., Deryabin P.N., Karal'nik B.V., Denisova T.G., Tugambaev T.I., Atshabar B.B., et al. Betaleukin influence on antigen-specific immune response indicators in model experiments of immunizing animals with live plague vaccine. *Tsitokiny i vospalenie*. 2014; 13(1): 57–62. (in Russian)
  8. Khaitov R.M. Immunomodulators: myths and reality. *Immunologiya*. 2020; (2): 1–6. <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-2-101-106> (in Russian)
  9. Khaitov R.M., Ataullakhanov R.I., Shul'zhenko A.E. *Immunotherapy: A Guide for Doctors [Immunoterapiya: rukovodstvo dlya vrachey]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2018. (in Russian)
  10. Lebedev V.V. Immunofan – synthetic peptide preparation of a new generation: immunological and pathogenetic aspects of clinical application. *Immunologiya*. 1999; (1): 25–30. (in Russian)
  11. Townsend D.M., He L., Hutchens S., Garrett T.E., Pazoles C.J., Tew K.D. NOV-002, a glutathione disulfide mimetic, as a modulator of cellular redox balance. *Cancer Res*. 2008; 68(8): 2870–7. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-07-5957>
  12. Antushevich A.A., Antonov V.G., Grebenyuk A.N., Antushevich A.E., Ladanova T.V., Burova E.B. Pathophysiological rationale of the effectiveness of glutoxim supportive therapy add-on to radiotherapy management of oropharyngeal cancer. *Vestnik Rossiyskoy voenno-meditsinskoy akademii*. 2013; (3): 32–7. (in Russian)
  13. Ataullakhanov P.I., Katlinskiy A.V., Kholms R.D., Master-nak T.B., Larin A.S., Malkina E.Yu., et al. The enhancement of the formation of antibodies under the influence of the gepon immune-modulator. *Immunologiya*. 2003; (1): 9–12. (in Russian)
  14. Order of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation N 708n «On Approval of the Rules for Laboratory Practice»; 2010. (in Russian)
  15. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of the European Union on the protection of animals used for scientific purposes. St. Petersburg.; 2010. (in Russian)
  16. МУ 3.3.1.1113-02. The basic requirements for vaccine strains of plague Microbe: methodical instructions. Moscow; 2002. (in Russian)
  17. Klyueva S.N., Shchukovskaya T.N. Adjuvants influence of new generation *in vitro* cytokine production by blood cells vaccinated against plague persons. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal*. 2015; 9(2): 201–8. (in Russian)
  18. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. *Statistical Methods in Microbiological Research [Statisticheskie metody v mikrobiologicheskikh issledovaniyakh]*. Leningrad: Medgiz; 1962. (in Russian)
  19. Quenee L.E., Ciletti N., Berube B., Krausz T., Elli D., Hermans T., et al. Plague in Guinea pigs and its prevention by subunit vaccines. *Am. J. Pathol.* 2011; 178(4): 1689–700. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.12.028>
  20. Bugorkova S.A., Shchukovskaya T.N., Mikshis N.I., Klyueva S.N., Kudryavtseva O.M., Kravtsov A.L., et al. Comprehensive immunological study of persons vaccinated with live plague vaccine living on the territory of the pre-Caspian sand foci of the plague in the republic of Kalmykia. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika*. 2018; 17(3): 38–50. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-3-38-50> (in Russian)
  21. Bogacheva N.V., Okhachkina V.Yu., Pyatkova N.V., Fedotov A.K., Kucherenko A.S. Experimental research of the influence of immunomodulators on efficiency using of brucellosis living dry vaccine. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika*. 2016; 15(2): 84–92. (in Russian)
  22. Andersson J.A., Sha J., Kirtley M.L., Reyes E., Fitts E.C., Dann S.M., et al. Combating multidrug-resistant pathogens with host-directed nonantibiotic therapeutics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2017; 62(1): 01943–17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01943-17>

### **Информация об авторах**

*Гончарова Анастасия Юрьевна*<sup>✉</sup> — к.м.н., н.с. отдела иммунологии РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия, [rusrapi@microbe.ru](mailto:rusrapi@microbe.ru), <https://orcid.org/0000-0002-9994-7936>

*Бугоркова Светлана Александровна* — д.м.н., и.о. зав. отделом иммунологии РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7548-4845>

*Щуковская Татьяна Николаевна* — д.м.н., профессор, г.н.с. отдела иммунологии РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8995-0895>

**Участие авторов.** Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 05.09.2022;  
принята к публикации 19.11.2022;  
опубликована 13.02.2023

### **Information about the authors**

*Anastasiya Yu. Goncharova*<sup>✉</sup> — Cand. Sci. (Med.), researcher, Department of immunology, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, [rusrapi@microbe.ru](mailto:rusrapi@microbe.ru), <https://orcid.org/0000-0002-9994-7936>

*Svetlana A. Bugorkova* — D. Sci. (Med.), Head, Department of immunology, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7548-4845>

*Tatyana N. Shchukovskaya* — D. Sci. (Med.), Professor, chief researcher, Department of immunology, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8995-0895>

**Author contribution.** All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 05.09.2022;  
accepted for publication 19.11.2022;  
published 13.02.2023