

НАУКА И ПРАКТИКА

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-415>



Оценка возможности применения иммуномодулирующих лекарственных препаратов для экстренной профилактики экспериментальной чумы, вызванной вирулентным штаммом основного подвида *Yersinia pestis*

Гончарова А.Ю.[✉], Бугоркова С.А., Кислицина Е.В., Германчук В.Г.

Российский противочумный институт «Микроб», Саратов, Россия

Аннотация

Введение. Иммуномодулирующие лекарственные препараты (ИЛП) обладают большим потенциалом для повышения неспецифической реактивности организма в комплексе мероприятий по экстренной профилактике (ЭП) особо опасных инфекций, в частности чумы. В качестве перспективных для исследования ИЛП отобраны препараты последнего поколения из групп высоко- и низкомолекулярных синтетических пептидов, тиопозитиновых препаратов и цитокинов.

Цель работы — оценить протективную эффективность применения ИЛП разных групп в экспериментах по моделированию заражения высоковирулентным штаммом чумного микроба на 2 видах биомоделей.

Материалы и методы. ИЛП (рекомбинантный интерферон- γ (рИФН- γ), азоксимера бромид (ПО), синтетические иммуномодулирующие олигопептиды O1, O2, O3) вводили белым мышам и морским свинкам подкожно по схеме: за 3 дня — 1 день — 1 ч до заражения вирулентным тест-штаммом чумы *Yersinia pestis* 231(708) в дозах от 1 до 625 КОЕ. Дополнительно перед заражением у белых мышей исследовали влияние ИЛП на продукцию цитокинов ИФН- γ и интерлейкина-10.

Результаты и обсуждение. Изучение влияния ИЛП на выживаемость невакцинированных биомоделей позволило установить, что только рИФН- γ и ПО увеличивают на 20–50% выживаемость двух типов лабораторных животных и значительно повышают значение ЛД₅₀. Однако все тестируемые ИЛП способствуют увеличению средней продолжительности жизни биомоделей не менее чем на 1 сут. После трёхкратного введения ИЛП белым мышам установлено увеличение спонтанной и митогениндуцированной продукции цитокинов только у белых мышей, получивших рИФН- γ и ПО, что коррелирует с показателями выживаемости животных.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют об эффективности применения ИЛП, особенно рИФН- γ и ПО, при защите макроорганизма от заражения *Y. pestis*, что определяет перспективность исследований по дальнейшему совершенствованию схем ЭП чумы. Цитокин ИФН- γ может служить маркером протективной эффективности ИЛП.

Ключевые слова: чума, иммуномодуляторы, выживаемость, экстренная профилактика

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 этическим комитетом Российского противочумного института «Микроб» (протоколы № 11 от 16.10.2019; № 3 от 05.03.2020; № 14 от 19.09.2022).

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., Кислицина Е.В., Германчук В.Г. Оценка возможности применения иммуномодулирующих лекарственных препаратов для экстренной профилактики экспериментальной чумы, вызванной вирулентным штаммом основного подвида *Yersinia pestis*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2024;101(2):248–258.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-415>

EDN: <https://www.elibrary.ru/wsvxkh>

Assessment of the effect of using immunomodulatory drugs for emergency prevention of experimental plague caused by a virulent strain of the main subspecies *Yersinia pestis*

Anastasiya Yu. Goncharova[✉], Svetlana A. Bugorkova, Ekaterina V. Kislitsina, Valery G. Germanchuk

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

Abstract

Introduction. Immunomodulatory drugs (IMD) have great potential to increase the nonspecific reactivity of the organism in a set of measures for emergency prevention of plague. The purpose of the work is to evaluate the protective effectiveness of the use of IMD of different groups in experiments on modeling infection with a highly virulent strain of the plague microbe.

Materials and methods. IMD (rIFN- γ — recombinant interferon-gamma, PO — azoximer bromide, synthetic immunomodulatory oligopeptides O1, O2, O3) was administered to white mice and guinea pigs subcutaneously thrice by the schedule 3 days, 1 day, and 1 hour prior the infection with a virulent test strain of plague *Yersinia pestis* 231 (708) at dose from 1 to 625 CFU. In addition, the effect of IMD on the production of IFN- γ and interleukin-10 was investigated in white mice before infection.

Results. The study of the effect of IMD on the survival of unvaccinated biomodels made it possible to establish that only rIFN- γ and PO increase the survival of two types of laboratory animals by 20–50% and significantly increase the LD₅₀. All tested IMD contribute to an increase in the average life expectancy of biomodels by at least one day. An increase in spontaneous and mitogen-induced cytokine production was found only in white mice receiving rIFN- γ and PO, which correlates with animal survival rates.

Conclusion. The obtained data indicate the effectiveness of the use of IMD, especially rIFN- γ and PO in protecting the macroorganisms from infection with *Y. pestis*, which determines the prospects for research on the further improvement of emergency prevention of plague.

Keywords: *plague, immunomodulators, survival, emergency prevention*

Ethical statement. The authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with the Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, 23.07.2010). The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Russian Anti-Plague Institute "Microbe" (protocols No. 11, October 16, 2019; No. 3, March 5, 2020; No. 14, September 19, 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.Yu., Bugorkova S.A., Kislitsina E.V., Germanchuk V.G. Assessment of the effect of using immunomodulatory drugs for emergency prevention of experimental plague caused by a virulent strain of the main subspecies *Yersinia pestis*. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(2):248–258.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-415>

EDN: <https://www.elibrary.ru/wsvxkh>

Введение

Чума — острое природно-очаговое инфекционное заболевание из группы карантинных инфекций, протекающее с исключительно тяжёлым общим состоянием, часто с развитием сепсиса. Коэффициент летальности бубонной чумы достигает 30–60%, а лёгочная чума при отсутствии лечения практически всегда приводит к летальному исходу. Широкое распространение природных очагов чумы и сохранение напряжённой эпизоотологической обстановки на отдельных территориях России, актуальная

угроза биотерроризма, продолжающиеся разработки биологического оружия и другие факторы риска возникновения эпидемических проявлений этого особо опасного заболевания обуславливают необходимость совершенствования существующих и разработку новых средств и схем специфической и экстренной профилактики (ЭП) чумы.

В комплексе мер как общей, так и специальной ЭП чумы по распоряжениям исполнительных органов власти России всем лицам, подвергшимся заражению или угрозе инфицирования, назначают

ся антибиотики и химиопрепараты широкого спектра действия: рифампицин, доксицилин, офлоксацин, пefлоксацин, ципрофлоксацин, а также их сочетания, позволяющие получить синергидный эффект (аминогликозиды с рифампицином или бета-лактамами; рифампицин с бета-лактамами; фторхинолоны с бета-лактамами и аминогликозидами) [1, 2]. Совершенствование ЭП чумы ведётся по нескольким направлениям: поиск новых высокоэффективных лекарственных антимикробных средств; разработка схем совместного применения экстренной антибактериальной превентивной терапии и специфической вакцинопрофилактики, что, по мнению многих исследователей, является наиболее действенным мероприятием при угрозе антропогенного распространения чумы [3]; оценка возможности применения современных иммуноадьювантов и иммуномодуляторов [4]. Каждый из этих подходов не лишён некоторых недостатков. При расширении перечня доступных антибактериальных препаратов для целей ЭП существует угроза риска появления антибиотикоустойчивых вирулентных штаммов, что является серьёзной проблемой здравоохранения [5]. Применение экстренной иммунизации живой чумной вакциной (ВЧЖ) на фоне проведения постконтактной этиотропной химиопрофилактики приводит к угнетению процесса формирования поствакцинального и постинфекционного иммунитета [6, 7]. Попытки использования для ЭП вакцины на основе антибиотикорезистентных штаммов чумного микроба сопряжены с высоким риском передачи признаков антибиотикорезистентности в процессе персистенции вакцинного штамма в организме привитых людей как патогенным, так и условно-патогенным микроорганизмам [8].

В этой связи исследование эффективности применения лекарственных препаратов, обладающих доказанным иммуномодулирующим потенциалом, с целью повышения неспецифической резистентности организма для профилактики и лечения инфекционных заболеваний стало активно развивающимся в последнее время направлением. Иммуномодулирующая терапия, по мнению многих авторов, обладает рядом преимуществ перед традиционным антимикробным лечением: не вызывает развития множественной лекарственной устойчивости среди микроорганизмов, позволяет значительно расширить подходы к лечению пациентов с иммунными расстройствами, может использоваться в качестве неспецифической неотложной терапии и профилактики в экстренных ситуациях [9]. В соответствии с основными требованиями, предъявляемыми к иммуномодулирующим лекарственным препаратам (ИЛП), используемым для ЭП инфекционных болезней, они должны обладать следующими характеристиками:

1. Обладать широким спектром активирующего влияния на иммунитет (как Т-, так и В-клеточное звено), иметь критерии (маркеры) оценки эффективности действия.
2. Быть безопасными, не иметь противопоказаний, не вызывать привыкания, побочных реакций, аллергических и канцерогенных эффектов.
3. Должны быть доступны для массового применения, быть зарегистрированы как лекарственное средство и произведены в России.
4. Обладать высокой совместимостью с вакцинными препаратами, а также антибиотико- и химиопрепаратами, повышая их эффективность и снижая терапевтическую дозу при совместном введении.

В той или иной степени данным критериям соответствуют ИЛП, используемые в исследованиях по совершенствованию ЭП сибирской язвы (ликопид, бактистатин) [7], туляремии (препарат цитокина интерлейкина (ИЛ)-12, имунофан) [10], сапа и миелоидоза (интерферон гамма (ИФН- γ), глутоксим, бестим, имунофан) [11, 12], холеры (ликопид, имунофан, полиоксидоний) [13], чумы (полиоксидоний, цитозин-гуанин олигодезоксинуклеотиды — СрG-ОДН) [14, 15].

Среди нескольких десятков ИЛП, различающихся как по химической структуре, так и по механизму действия, на основании данных литературы и ранее проведённых нами исследований [4, 16, 17] в качестве перспективных для применения в комплексе мероприятий по ЭП чумы были отобраны современные коммерческие ИЛП из групп тиопозитиновых препаратов (глутамил-цистеинил-глицин динатрия — О1), синтетических пептидов (треонил-глутамил-лизил-лизил-аргинил-аргинил-глутамил-треонил-валил-глутамил-аргинил-глутамил-лизил-глутамат — О2; аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинин — О3), цитокинов (рекомбинантный интерферон-гамма — рИФН- γ), а также синтетический высокомолекулярный полиэлектролит — азоксимера бромид (ПО). Все использованные ИЛП — российского производства, разрешены к применению у взрослых и детей с 2–3 лет, обладают наряду с иммуномодулирующим, детоксицирующим (ПО, О3), гепатопротективным (О1, рИФН- γ , О3), антиоксидантным (ПО, О3), антибиотикопотенцирующим (ПО, О1) действием. Ранее нами была доказана безвредность всех испытуемых ИЛП при совместном использовании с ВЧЖ в гисто- и патоморфологическом исследовании на морских свинках, а также эффективное снижение средней иммунизирующей дозы вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ (ImD₅₀) [4, 16, 17].

Цель данной работы — оценить протективную эффективность применения ИЛП разных групп в

экспериментах по моделированию заражения высоковирулентным штаммом чумного микроба на 2 видах биомоделей.

Материалы и методы

Штаммы

В работе использовали вирулентный штамм *Y. pestis* 231(708) основного подвида, полученный из Государственной коллекции патогенных бактерий Российского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора.

Иммуномодулирующие препараты

Дозы препаратов — О1 («Фарма Вам»), О2 («Иммафарма»), О3 («Бионокс НПП»), ПО («НПО Петровакс Фарм»), человеческий рИФН-γ («Фармаклон») — для введения биомоделям выбраны, исходя из рекомендуемой производителями дозы для человека с учётом перерасчёта на массу тела животного (табл. 1).

Лабораторные животные

Эксперименты проводили на беспородных белых мышах массой $21,5 \pm 3,5$ г и на морских свинках массой 375 ± 75 г, полученных из питомника Российского противочумного института «Микроб». Эти виды чаще всего используются в исследованиях по заражению возбудителем чумы и предусмотрены нормативными документами к применению для оценки протективных свойств вакцин и схем их введения. Манипуляции с животными, а также выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с Приказом Минздрава России от 01.04.2016 № 199Н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики», Директивой № 2010/63/ЕС Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 «О защите животных, используемых для научных целей» и «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010). Протоколы исследований одобрены Комиссией по биоэтике при Российском противочумном институте «Микроб» Роспотребнадзора (протоколы № 11 от 16.10.2019; № 3 от 05.03.2020; № 14 от 19.09.2022).

Питательные среды

Культуры штаммов выращивали на агаре Хоттингера рН $7,2 \pm 0,1$ (производство Российского противочумного института «Микроб»).

Оценка протективности

Животным (беспородные белые мыши, морские свинки) опытных групп вводили исследуемые ИЛП подкожно в дозах, указанных в табл. 1, трехкратно по схеме: за 3 дня — 1 день — 1 ч до заражения вирулентным тест-штаммом чумы *Y. pestis* 231(708). В контрольную группу входили интактные лабораторные мыши и морские свинки, которым подкожно вводили физиологический раствор в объёме 0,2 и 0,5 мл соответственно. Заражение животных опытных и контрольной групп осуществляли тест-штаммом *Y. pestis* 231(708) в пятикратно возрастающей концентрации от 1 до 625 КОЕ. Наблюдение за животными проводили в течение 15 дней, в конце эксперимента всех выживших животных умерщвляли с помощью паров хлороформа. Гибель биомодели от чумы подтверждали наличием характерных для чумной инфекции патологоанатомических изменений; чумного микроба в мазках-отпечатках из органов павших животных, окрашенных по Граму; положительного результата высевов из органов и крови на пластинки агара Хоттингера рН ($7,2 \pm 0,1$), содержащие стимулятор роста сульфит натрия ($0,024 \pm 0,001\%$) и генцианвиолет ($0,0045 \pm 0,0005\%$).

У животных определяли показатели выживаемости (процентное соотношение выживших на конец эксперимента животных к общему количеству взятых в эксперимент животных данной группы), среднюю продолжительность жизни павших в эксперименте животных, длительность инкубационного периода до начала манифестации заболевания, среднюю смертельную/летальную дозу (LD_{50} — статистически установленную дозу, которая при однократном введении вызывает гибель 50% взятых в эксперимент животных) заражающего тест-штамма чумы и индекс иммунитета (ИИ) — отношение величины LD_{50} для животных опытной группы к величине LD_{50} для животных контрольной группы.

Таблица 1. Препараты, использованные для иммунизации биопробных животных

Table 1. Preparations used for immunization of bioassay 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 dose	n	доза dose	n
О1, мкг µg	40	64	400	24
О2, мкг µg	30	70	300	20
О3, мкг µg	1	72	10	20
ПО, мкг PO, µg	4	64	50	32
рИФН-γ, МЕ rIFN-γ, IU	150	64	2000	32

Учитывали процент обсеменения чумным микробом внутренних органов павших и выживших биопробных животных.

Цитокиновый профиль

Продукцию цитокинов — ИФН- γ и ИЛ-10 — в клеточных культурах крови мышей определяли перед заражением на 3-и сутки после начала введения ИЛП с помощью твердофазного иммуноферментного анализа с применением коммерческих тест-систем («Abscam», «BioScience») на автоматическом иммуноферментном анализаторе «Lazurit» («Dyplex Technologies») при длине волны 450 нм. Для этого венозную кровь с антикоагулянтом (гепарин, «Синтез») разводили в соотношении 1 : 4 средой RPMI-1640 («PanEco»), содержащей 100 мкг/мл гентамицина («Мосхимфармпрепараты им. Н.А. Семашко»), затем делили на две равные части. В одну часть вносили 100 мкл стандартного

T-клеточного митогена конканавалина А («Sigma») в конечной концентрации 15 мкг/мл (индуцированная продукция), в другую — 100 мкл физиологического раствора (спонтанная продукция). Опытные и контрольные образцы инкубировали в течение 24 ч при 37°C. После инкубации клетки осаждали центрифугированием в стандартных условиях и отбирали супернатанты.

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 корреляционно-регрессионного анализа (коэффициент корреляции Пирсона). Достоверность различий сравниваемых величин оценивали с помощью парного t-критерия Стьюдента и W-критерия Вилкок-

Таблица 2. Влияние ИЛП на выживаемость биопробных животных при подкожном заражении вирулентным тест-штаммом *Y. pestis* 231

Table 2. The effect of immunomodulatory drugs on the survival of bioassay animals during subcutaneous infection with a virulent test strain *Y. pestis* 231

Иммунизирующий препарат Immunizing medication	Биомодель Biomodel	Доза <i>Y. pestis</i> 231, LD ₅₀ Dose of <i>Y. pestis</i> 231, LD ₅₀	Число животных (выжившие/общее количество) Number of animals (survived/inoculated)	Средняя продолжительность жизни, сут Mean time-to-death, days <i>M</i> ± <i>m</i>	ЛД ₅₀ , КОЕ LD ₅₀ , CFU	ИИ Immunity index
Физиологический раствор PBS	Белая мышь White mice	5	2/10	3,7 ± 0,5	5	–
		25	0/10	3,5 ± 0,2		
	Морская свинка Guinea pigs	5	0/5	4,9 ± 0,7		
		25	0/10	4,6 ± 0,6		
pИФН- γ rIFN- γ	Белая мышь White mice	5	3/9	7,5 ± 0,4*	12	2,4
		25	1/8	6,2 ± 0,3*		
	Морская свинка Guinea pigs	5	2/6	6,5 ± 0,8*		
		25	1/10	6,1 ± 0,4		
ПО PO	Белая мышь White mice	5	5/8	7,3 ± 0,4*	20	4
		25	2/8	6,4 ± 0,8*		
	Морская свинка Guinea pigs	5	3/6	7,5 ± 0,3*		
		25	2/6	7,2 ± 0,4*		
O1	Белая мышь White mice	5	5/8	6,0 ± 0,7*	16	3,2
		25	2/8	5,4 ± 0,4*		
	Морская свинка Guinea pigs	5	2/6	6,9 ± 0,4*		
		25	0/6	7,5 ± 0,8*		
O2	Белая мышь White mice	5	2/10	6,6 ± 2,2*	5	1
		25	0/8	5,2 ± 0,9*		
	Морская свинка Guinea pigs	5	0/5	7,2 ± 1,6		
		25	0/5	6,4 ± 0,4*		
O3	Белая мышь White mice	5	3/9	7,5 ± 0,3*	9	1,8
		25	1/10	6,8 ± 0,6*		
	Морская свинка Guinea pigs	5	1/5	6,6 ± 0,6*		
		25	0/5	6,3 ± 0,6*		

Примечание. **p* < 0,05 по сравнению с контрольной группой.

Note. **p* < 0.05 compared to the control group.

сона. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Ранее было установлено, что однократное введение всех исследуемых ИЛП непосредственно перед заражением высоковирулентным штаммом *Y. pestis* 231 (708) не влияет на развитие патологического процесса, показатели выживаемости и среднюю продолжительность жизни лабораторных животных [4, 17, 18]. Экспериментально подтверждено, что для положительного эффекта необходимо минимум трёхкратное введение препарата, например, по схеме: за 3 дня — 1 день — 1 ч перед

заражением. В данном исследовании в условиях моделирования бубонной формы чумной инфекции стояла задача оценить эффективность отработанной ранее схемы экстренного применения различных групп ИЛП, различающихся по механизму действия.

Установлено, что трёхкратное применение ИЛП до заражения белых мышей приводит к увеличению ЛД₅₀ и ИИ во всех опытных группах, кроме животных, иммунизированных О2 (табл. 2). Выживаемость белых мышей, иммунизированных рИФН-γ, ПО, О1 и О3, составила в среднем 36, 59, 50 и 26% соответственно. При заражающей дозе 25–30 ЛД₅₀ *Y. pestis* 231 выживаемость снижалась

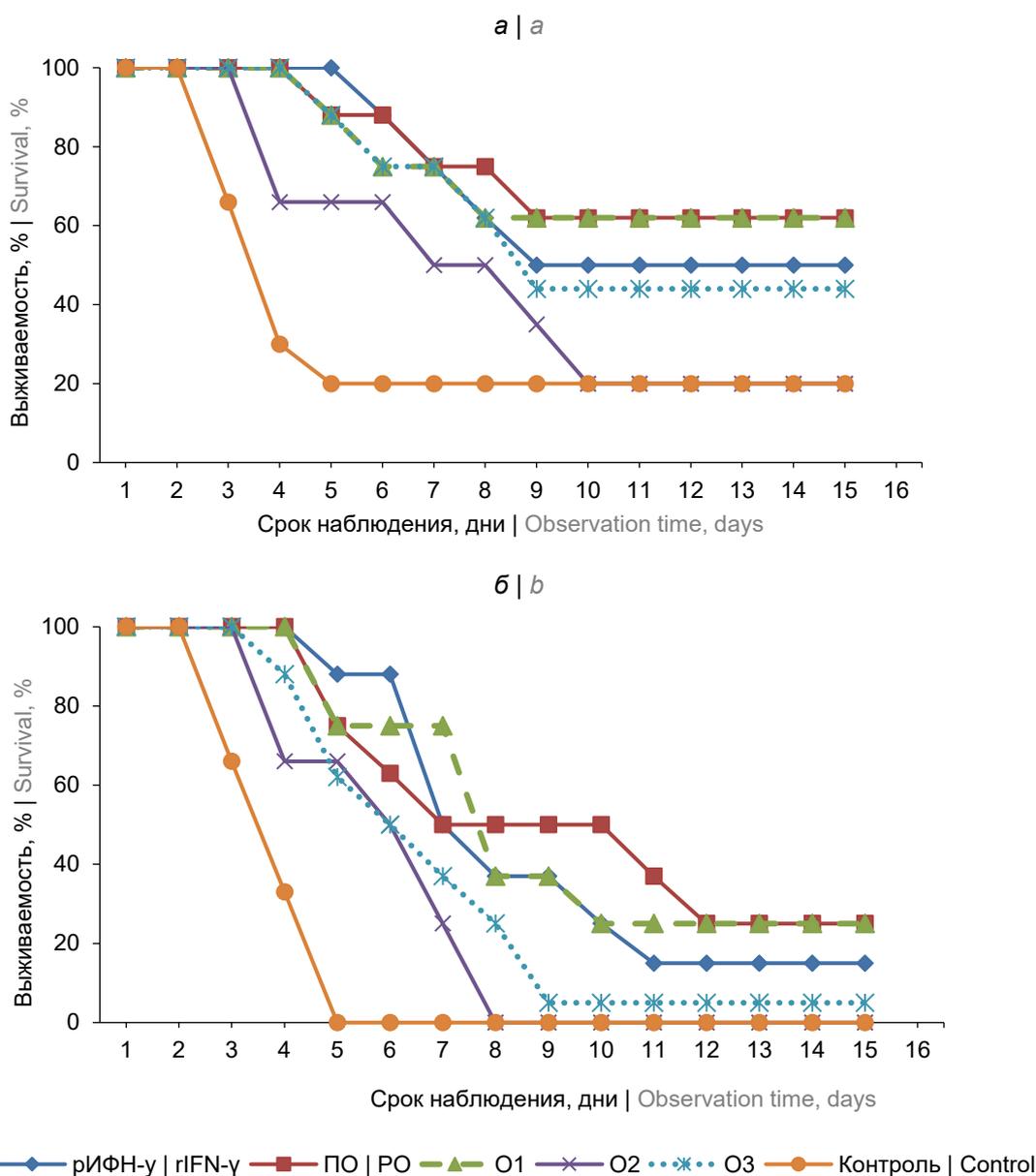


Рис. 1. Влияние ИЛП на продолжительность жизни белых мышей в условиях подкожного заражения 5 ЛД₅₀ (а) и 25 ЛД₅₀ (б) *Y. pestis* 231.

Fig. 1. The effect of immunomodulators on survival of white mice after subcutaneous challenge with 5 LD₅₀ (a) and 25 LD₅₀ (b) *Y. pestis* strain 231.

до 0–5%, кроме групп, иммунизированных рИФН- γ (15%), О1 и ПО (по 25%) (рис. 1).

Во всех опытных группах отмечено увеличение средней продолжительности жизни павших животных, в большей степени у мышей, иммунизированных рИФН- γ , ПО и О3, на 24–96 ч в зависимости от типа биомодели и инфицирующей дозы вирулентного штамма (табл. 2). При применении рИФН- γ , ПО и О1 зарегистрировано пролонгирование инкубационного периода до начала заболевания у павших животных в среднем на 24–48 ч.

Достоверное увеличение ($p < 0,05$) показателей выживаемости и ИИ в опытах с морскими свинками зарегистрировано только при применении рИФН- γ и ПО (рис. 2). Выживаемость морских свинок в этих группах составила в среднем 22 и 36% соответственно. Влияние ИЛП на среднюю продолжительность жизни и инкубационный период отмече-

но во всех опытных группах, но в большей степени при применении ПО, О1 и О2.

Выжившие животные были забиты на 15-е сутки после заражения, из селезёнки и печени всех павших, а также 5 (8,6%) из 58 выживших белых мышей и 1 (3,8%) из 26 выживших морских свинок выделена культура заражающего штамма *Y. pestis* 231. Обсеменение внутренних органов зарегистрировано у животных, получивших максимальную заражающую дозу *Y. pestis* 231: 125 КОЕ — белые мыши и 625 КОЕ — морские свинки. У оставшихся в живых животных группы, иммунизированной ПО, культура *Y. pestis* 231 выделена не была.

У белых мышей как контрольной, так и опытных групп перед заражением проводили забор крови и определение биомаркерных для характеристики противочумного иммунного ответа цитокинов — ИФН- γ и ИЛ-10 [19]. По данным имму-

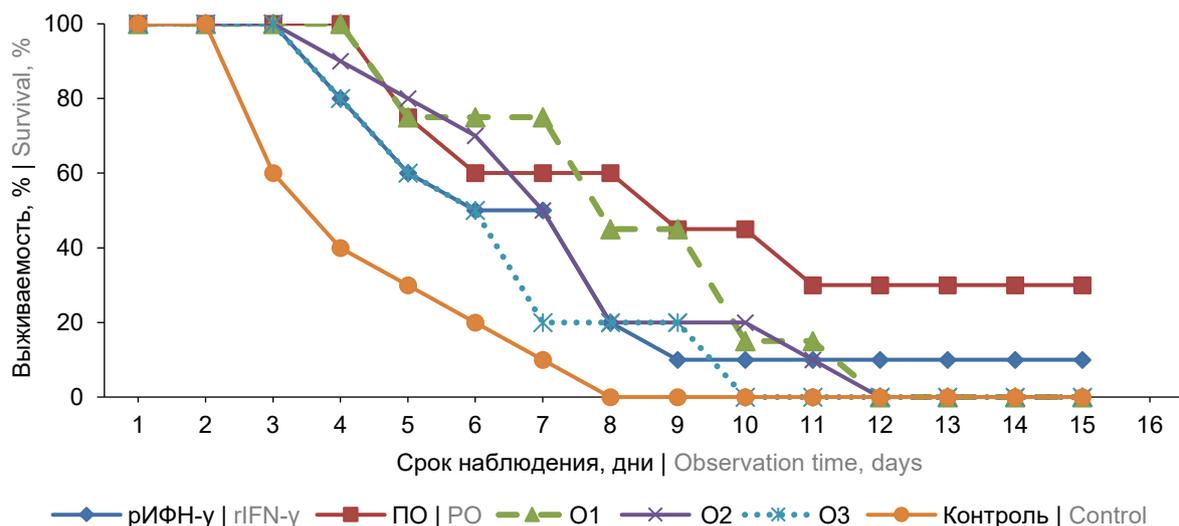


Рис. 2. Влияние ИЛП на продолжительность жизни морских свинок в условиях подкожного заражения 25 ЛД₅₀ *Y. pestis* 231.

Fig. 2. The effect of immunomodulators on survival of guinea pigs after subcutaneous challenge with 25 LD₅₀ *Y. pestis* strain 231.

Таблица 3. Влияние трёхкратного введения ИЛП на уровень цитокинов у иммунизированных белых мышей Ме (Q₁–Q₃)
Table 3. The effect of three-time administration of immunomodulatory drugs on the level of cytokines in immunized white mice Me (Q₁–Q₃)

Иммунизирующий препарат Immunizing medication	ИФН- γ , пг/мл IFN- γ , pg/ml		ИЛ-10, пг/мл IL-10, pg/ml	
	спонтанная продукция spontaneous production	митоген-индуцированная продукция induced production	спонтанная продукция spontaneous production	митоген-индуцированная продукция induced production
Физиологический раствор PBS	20,2 (14,0–26,2)	32,6 (23,5–41,7)	9,8 (7,6–12,2)	11,6 (10,8–12,5)
рИФН- γ rIFN- γ	60,2* (42,2–68,7)	96,7* (70,5–107,0)	51,1* (44,4–63,1)	55,6* (48,9–74,0)
ПО PO	52,1* (32,4–64,5)	60,3* (56,4–71,0)	17,7* (13,8–19,3)	22,3* (18,5–24,2)
О1	25,2 (12,2–38,7)	56,7* (44,5–77,0)	11,1 (4,4–23,1)	25,6* (18,9–44,0)
О2	26,0 (18,0–34,2)	39,6 (29,4–47,6)	14,5 (8,6–23,3)	19,4 (8,6–36,8)
О3	27,1 (20,2–34,1)	54,5* (49,5–71,0)	17,7* (14,0–19,8)	22,9* (19,6–24,7)

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

Note. * $p < 0.05$ compared to the control group.

ноферментного анализа установлено увеличение спонтанной и митоген-индуцированной продукции исследуемых цитокинов при применении рИФН-γ и ПО (табл. 3). Применение О1 и О3 влияло только на митоген-индуцированную продукцию указанных цитокинов. У мышей, иммунизированных О2, значения ИФН-γ и ИЛ-10 в крови регистрировали на уровне контрольных показателей. Выявлена высокая корреляционная зависимость между показателем выживаемости животных и уровнем митоген-индуцированной продукции ИФН-γ ($r = 0,94$; $p = 0,038$). Установлена корреляционная связь между показателями выживаемости белых мышей и уровнем митоген-индуцированной продукции ИЛ-10 ($r = 0,8$; $p = 0,078$), однако связь эта не была достоверной.

Обсуждение

Применение ИЛП как важная составляющая ЭП инфекций помогает решить ряд задач: преодоление разнообразных побочных эффектов от массивной антибиотикотерапии и снижение дозы назначаемых химиопрепаратов; коррекция первичных и вторичных иммунодефицитных состояний; усиление иммунного ответа при помощи индукции неспецифических и специфических факторов иммунитета; потенцирование действия вакцинных препаратов; удлинение инкубационного периода до развития манифестации заболевания [7, 9]. Последнее обстоятельство особенно важно при чумной инфекции, т.к. важнейшими условиями выживания пациентов и профилактики осложнений после заражения являются быстрая диагностика и раннее начало лечения до развития генерализации инфекционного процесса. Несвоевременное назначение антибактериальных препаратов, с одной стороны, резко повышает риск развития летального исхода [20], а с другой — может привести к появлению антибиотикорезистентных штаммов возбудителя чумы [5]. Включение в схемы и методы ЭП чумы препаратов, обладающих иммунотропными свойствами, позволяет, во-первых, корректировать фоновое состояние неспецифической резистентности, что во многом определяет развитие и исход любого инфекционного процесса [7], а во-вторых, активировать как гуморальное, так и клеточное звено иммунной системы, что способствует предотвращению инфекции и/или снижению риска развития тяжёлого течения болезни.

При моделировании экспериментальной чумы установлено, что все тестируемые ИЛП обеспечивают увеличение средней продолжительности жизни биомоделей не менее чем на сутки. Данный эффект очень важен в лечебной практике, т.к. дополнительные 24 ч на принятие решения о назначении этиотропной терапии позволяют минимум на 50% повысить шансы на выздоровление

пациента [21, 22]. Кроме того, применение ИЛП создаёт резерв времени для замены неэффективного или малоэффективного антибактериального препарата, назначенного в рамках общей ЭП, на высокоэффективный химиопрепарат по результатам определения антибиотикочувствительности выделенной культуры *Y. pestis*.

Нами установлено, что применение рИФН-γ и ПО повышает на 20–50% выживаемость лабораторных животных — как мышей, так и морских свинок — и влияет на увеличение ИИ не менее чем в 2 раза, что является очень обнадеживающим результатом для ЭП особо опасного заболевания. Так, в схемах ЭП мелиоидоза использование олигопептидного иммуномодулятора О3 также приводило к 20% повышению выживаемости экспериментальных животных [11], а применение Т.А. Бондаревой и соавт. иммуномодулятора ПО совместно с антибиотиками при ЭП чумы повышало выживаемость на 26–60%, увеличивая среднюю продолжительность жизни белых мышей [14]. Немаловажным фактом было то, что применение иммуномодулятора ПО предотвращало не только гибель заражённых белых мышей и морских свинок, но и обсеменение их внутренних органов *Y. pestis*, что согласуется с ранее полученными Б.В. Каральник и соавт. данными о влиянии ПО на иммуногенную и протективную активность ВЧЖ [23].

Исследование биомаркерных для чумной инфекции цитокинов — ИФН-γ и ИЛ-10 — позволяет определить реактивность клеток иммунной системы и их готовность к реагированию на патоген [24]. После трёхкратного введения ИЛП белым мышам установлено увеличение спонтанной и митоген-индуцированной продукции цитокинов, особенно у животных, получавших рИФН-γ и ПО. Наши данные по оценке корреляционной связи между уровнем ИФН-γ и долей выживших животных, значениями LD_{50} и ИИ соотносятся с ранее полученными [19] информативными коррелятами защиты как мышей, так и привитых людей от чумы. Повышение индуцированной продукции ИФН-γ можно использовать в качестве адекватного маркера протективной эффективности иммунизации ИЛП, как и ВЧЖ.

В выборе ИЛП для лечения и профилактики инфекционных заболеваний важно учитывать механизм и направленность действия иммуномодулятора на структуру иммунной системы [25]. Несмотря на то что иммунофармакология развивается в направлении разработки препаратов, избирательно действующих на различные звенья иммунной системы, при чумной инфекции большую эффективность продемонстрировали препараты, стимулирующие как клеточный и гуморальный иммунитет, так и неспецифическую резистентность организма. Препарат О1, относящийся к классу тиопозтинов,

и препарат ОЗ, являющийся синтетическим аналогом фрагмента гормона тимуса — тимопоэтина, в большей степени ответственны за клеточный иммунитет, что выражается в стимуляции продукции ассоциированного с Th1-клетками иммунной системы цитокина ИФН- γ . В данном исследовании эти ИЛП способствовали увеличению выживаемости и средней продолжительности жизни белых мышей, заражённых высоковирулентным штаммом чумы. Однако применение О1, О2 и О3 у морских свинок, хотя и позволило увеличить среднюю продолжительность жизни биомоделей, не способствовало повышению выживаемости экспериментальных животных. Применение ИЛП с более широким спектром воздействия на иммунную систему макроорганизма показало наибольшую эффективность для ЭП экспериментальной чумы. Так, препарат рИФН- γ на основе ключевого иммуномодулятора воспаления, запускающего каскад защитных иммунологических реакций, вызывающих активацию эффекторных функций макрофагов, нейтрофилов, естественных киллерных клеток, цитотоксических Т-лимфоцитов [26], и синтетический полиэлектролит ПО, оказывающий стимулирующее действие на неспецифическую резистентность организма, активирующий все звенья фагоцитарного процесса, гуморальный и клеточный иммунный ответ, кроме того, обладающий мощным детоксицирующим действием, что используется при лечении различных септических состояний [27], не только способствовали повышению выживаемости и средней продолжительности жизни биопробных животных при их применении, но и повышали продукцию собственных цитокинов (ИФН- γ , ИЛ-10), что позволяет рекомендовать включение в схемы ЭП чумы именно ИЛП широкого спектра действия.

Заключение

Полученные обнадёживающие экспериментальные результаты позволяют судить о перспективности применения ИЛП в схемах ЭП чумной инфекции. Среди большого количества разнонаправленных ИЛП при ЭП чумы предпочтительнее использовать препараты, обладающие широким спектром активирующего влияния на иммунитет, адекватным маркером эффективности их действия можно считать повышение индуцированной продукции цитокина ИФН- γ . Возможными средствами иммуномодуляции при ЭП чумы могут стать препараты рИФН- γ и ПО, однако для последующей рекомендации включения этих ИЛП в схемы ЭП чумы у людей необходимо проведение дополнительных исследований как *in vivo* (с использованием других видов биомоделей: кроликов, приматов), так и *in vitro* (для оценки динамики показателей иммунитета, у иммунизированных добровольцев).

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Малеев В.В., ред. *Экстренная профилактика и лечение опасных инфекционных болезней: Методические рекомендации*. М.; 2009. Maleev V.V., ed. *Emergency Prevention and Treatment of Dangerous Infectious Diseases: Methodological Recommendations*. Moscow; 2009.
2. Щипелева И.А., Марковская Е.И. Антибиотики. Чума. Эксперимент. Опыт работы Ростовского-на-Дону научно-исследовательского противочумного института: исторический обзор. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2018;7(3):80–7. Shchipeleva I.A., Markovskaya E.I. Antibiotics. Plague. Experiment. Research work experience of the Rostov-on-Don anti-plague research institute (historical overview). *Infectious diseases. News, Opinions, Training*. 2018;7(3):80–7. DOI: <https://doi.org/10.24411/2305-3496-2018-13012> EDN: <https://elibrary.ru/ylhrfl>
3. Попова А.Ю., Кутырев В.В., ред. *Специфическая профилактика чумы: состояние и перспективы*. Саратов; 2021. Popova A.Yu., Kuttyrev V.V., eds. *Specific Prevention of the Plague: Status and Prospects*. Saratov; 2021.
4. Гончарова А.Ю., Бугоркова С.А., Шуковская Т.Н. и др. Разработка экспериментальных схем экстренной профилактики чумы на основе применения рекомбинантного интерферона гамма. *Инфекционные болезни*. 2022;20(4):68–74. Goncharova A.Yu., Bugorkova S.A., Shchukovskaya T.N., et al. Development of experimental schemes for emergency vaccination against plague using recombinant interferon- γ . *Infectious Diseases*. 2022;20(4):68–74. DOI: <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2022-4-56-62>
5. Guiyoule A., Gerbaud G., Buchrieser C., et al. Transferable plasmid-mediated resistance to streptomycin in a clinical isolate of *Yersinia pestis*. *Emerging Infect. Dis.* 2001;7(1):43–8. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid0701.010106>
6. Byme W.R., Weikos S.L., Pitt M.L., et al. Antibiotic treatment of experimental pneumonia plaque in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998;48(3):675–81. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.42.3.675>
7. Антонов В.А., Жукова С.И., Демьянова О.Б., Абдрахманова Р.О. Проблема экстренной профилактики инфекционных болезней. *Волгоградский научно-медицинский журнал*. 2015;(1):24–31. Antonov V.A., Zhukova S.I., Dem'yanova O.B., Abdrakhmanova R.O. The problem of emergency prophylaxis of infectious diseases. *Volgograd Journal of Medical Research*. 2015;(1):24–31. EDN: <https://elibrary.ru/tyzabz>
8. Орлова Н.В. Антибиотикорезистентность и современная стратегия антибактериальной терапии. *Медицинский совет*. 2022;16(8):89–97. Orlova N.V. Antibiotic resistance and modern strategy of antibacterial therapy. *Medical Council*. 2022;16(8):89–97. DOI: <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2022-16-8-89-97> EDN: <https://elibrary.ru/cvafqb>
9. Булгакова В.А. Иммуномодуляторы для профилактики и лечения острых респираторных инфекций: эффективность азоксимера бромид. *Терапевтический архив*. 2014;86(12):92–7. Bulgakova V.A. Immunomodulators for the prevention and treatment of acute respiratory infections: efficacy of Azoximer bromide. *Terapevticheskii arkhiv*. 2014;86(12):92–7. DOI: <https://doi.org/10.17116/terarkh2014861292-97> EDN: <https://elibrary.ru/tmpmct>
10. Pammit M.A., Budhavarapu V.N., Raulie E.K., et al. Intranasal interleukin-12 treatment promotes antimicrobial clearance and survival in pulmonary *Francisella tularensis* subsp. *novicida* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004;48(12):4513–9. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.48.12.4513-4519.2004>
11. Хабарова И.А., Жукова С.И., Ротов К.А. и др. Экстренная профилактика экспериментального мелниоза с использованием синтетических иммуномодуляторов и гетерологичных вакцин. *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина*. 2018;22(3):340–50.

- Khabarova I.A., Zhukova S.I., Rotov K.A., et al. Emergency prophylaxis of experimental melioidosis using synthetic immunomodulators and heterologous vaccines. *RUDN Journal of Medicine*. 2018;22(3):340–50.
DOI: <https://doi.org/10.22363/2313-0245-2018-22-3-340-350>
EDN: <https://elibrary.ru/ynajxn>
12. Propst K.L., Troyer R.M., Kelliham L.M., et al. Immunotherapy markedly increases the effectiveness of antimicrobial therapy for treatment of *Burkholderia pseudomallei* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010;54(5):1785–92.
DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.01513-09>
13. Филиппенко А.В., Иванова И.А., Омелъченко Н.Д., Труфанова А.А. Влияние иммуномодуляторов на формирование поствакцинального противохолерного иммунитета. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(1):81–92. Filippenko A.V., Ivanova I.A., Omel'chenko N.D., Trufanova A.A. The influence of immunomodulators on the formation of vaccine-induced cholera immunity. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2022;99(1):81–92.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-188>
EDN: <https://elibrary.ru/shtorf>
14. Бондарева Т.А., Поярков А.Ю., Вахнов Е.Ю. Использование полиоксидония в комплексном лечении генерализованных форм экспериментальной чумы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2009;(1):67–9. Bondareva T.A., Poyarkov A.Yu., Vakhnov E.Yu. Application of polyoxidonium in the mixed treatment of experimental plague generalized forms. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2009;(1):67–9.
EDN: <https://elibrary.ru/jwztsv>
15. Hickey A., Lin J., Kummer L., et al. Intranasal prophylaxis with CpG oligodeoxy-nucleotide can protect against *Yersinia pestis* infection. *Infect. Immun.* 2013;81(6):2123–32.
DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.00316-13>
16. Гончарова А.Ю., Бугоркова С.А., Кудрявцева О.М. и др. Экспериментальная оценка эффективности применения вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ в сочетании с иммуномодуляторами. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020;(2):71–7. Goncharova A.Yu., Bugorkova S.A., Kudryavtseva O.M., et al. Experimental evaluation of application of the vaccine strain *Yersinia pestis* EV NIEG in combination with immune-modulators. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2020;(2):71–7.
DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-2-71-77>
EDN: <https://elibrary.ru/fbjedk>
17. Гончарова А.Ю., Бугоркова С.А., Щуковская Т.Н. Повышение иммуногенной и протективной активности вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ с использованием синтетических иммуномодуляторов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(1):84–94. Goncharova A.Yu., 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*. 2023;100(1):84–94.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-335>
EDN: <https://elibrary.ru/ipltxb>
18. 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. 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 NIEG in experimental plague. *Russian Journal of Immunology*. 2020;23(1):41–50.
DOI: <https://doi.org/10.46235/1028-7221-005-IOP>
EDN: <https://elibrary.ru/jewstw>
19. Ключева С.Н., Бугоркова С.А., Каштанова Т.Н. Выявление коррелятов протекции от *Yersinia pestis* на мышинной модели и оценка возможности применения их в качестве маркеров эффективности вакцинации у людей. *Инфекция и иммунитет*. 2022;12(2):253–62. Klyueva S.N., Bugorkova S.A., Kashtanova T.N. Identifying correlates of protection from *Yersinia pestis* on a mouse model and assessing an opportunity for their use as markers of human vaccination efficiency. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2022;12(2):253–62.
DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-ICO-1734>
EDN: <https://elibrary.ru/gxukty>
20. Andersson J.A., Sha J., Kirtley M.L., et al. Combating multidrug-resistant pathogens with host-directed nonantibiotic therapeutics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2017; 62(1):e01943-17.
DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.01943-17>
21. Li Y., Li D., Shao H., et al. Plague in China 2014 — all sporadic case report of pneumonic plague. *BMC Infect. Dis.* 2016;16:85.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1403-8>
22. Kumar A. An alternate pathophysiologic paradigm of sepsis and septic shock: implications for optimizing antimicrobial therapy. *Virulence*. 2014;5(1):80–97.
DOI: <https://doi.org/10.4161/viru.26913>
23. Каральник Б.В., Пономарева Т.С., Дерябин П.Н. и др. Влияние иммуномодуляции на иммуногенную и протективную активность живой чумной вакцины. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2014;91(6):108–12. Karal'nik B.V., Ponomareva T.S., Deryabin P.N., et al. Effect of immune modulation on immunogenic and protective activity of a live plague vaccine. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2014;91(6):108–12.
EDN: <https://elibrary.ru/tucmmt>
24. Williamson E.D. The role of immune correlates and surrogate markers in the development of vaccines and immunotherapies for plague. *Adv. Prev. Med.* 2012;2012:365980.
DOI: <https://doi.org/10.1155/2012/365980>
25. Хайтов Р.М. Иммуномодуляторы: мифы и реальность. *Иммунология*. 2020;41(2):1–6. Khaitov R.M. Immunomodulators: myths and reality. *Immunologiya*. 2020;41(2):1–6.
DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-2-101-106>
EDN: <https://elibrary.ru/vpicjn>
26. Schroder K., Hertzog P.J., Ravasi T., Hume D. A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 2004;75(2):163–89.
DOI: <https://doi.org/10.1189/jlb.0603252>
27. Пинегин Б.В., Некрасов А.В., Хайтов Р.М. Иммуномодулятор Полиоксидоний: механизмы действия и аспекты клинического применения. *Цитокины и воспаление*. 2004;3(3):41–7. Pinegin B.V., Nekrasov A.V., Khaitov R.M. Immunomodulator Polyoxidonium: mechanisms of action and aspects of clinical application. *Cytokines and Inflammation*. 2004;3(3):41–7.
EDN: <https://elibrary.ru/hrrkjo>

Информация об авторах

Гончарова Анастасия Юрьевна[✉] — к.м.н., н.с. отдела иммунологии Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, rusrap@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9994-7936>

Information about the authors

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

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

Кислицина Екатерина Владимировна — м.н.с. отдела экспериментальных животных с виварием Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7565-2383>

Германчук Валерий Геннадиевич — д.м.н., г.н.с. отдела экспериментальных животных с виварием Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8986-3640>

Участие авторов: *Гончарова А.Ю.* — сбор и обработка материала, статистическая обработка, написание текста; *Бугоркова С.А.* — концепция и дизайн исследования, редактирование; *Кислицина Е.В., Германчук В.Г.* — организация сбора и обработки материала. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ИСМЕ, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 01.10.2023;
принята к публикации 12.12.2023;
опубликована Online First 28.02.2024;
опубликована 29.04.2024

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>

Ekaterina V. Kislitsina — junior researcher, Department of experimental animals with vivarium, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe, Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7565-2383>

Valery G. Germanchuk — D. Sci. (Med.), chief researcher, Department of experimental animals with vivarium, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8986-3640>

Author contribution: *Goncharova A.Yu.* — collection and processing of material, statistical processing, writing of text; *Bugorkova S.A.* — concept and design of the study, editing; *Kislitsina E.V., Germanchuk V.G.* — organization of the collection and processing of material. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, 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 01.10.2023;
accepted for publication 12.12.2023;
published Online First 28.02.2024;
published 29.04.2024