

# ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЯ СОПОЛИМЕРА N-ВИНИЛПИРРОЛИДОНА И 2-МЕТИЛ-5-ВИНИЛПИРИДИНА ПРИ ВИРУСНОЙ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ КРОЛИКОВ

Еремин Д.В.<sup>1,2</sup>, Панов А.В.<sup>1,2</sup>, Кочкина Ю.В.<sup>1,2</sup>, Селянинов Ю.О.<sup>3</sup>, Зубаиров М.М.<sup>3</sup>, Кедик С.А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Московский технологический университет, г. Москва.

<sup>2</sup> ЗАО «Институт фармацевтических технологий», г. Москва.

<sup>3</sup> ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии, 601125, Владимирская область, пос. Вольгинский.

## IMMUNOSTIMULATORY ACTIVITY OF COPOLYMER N-VINYLPYRROLIDONE AND N-2-METHYL- 5-VINYLPYRIDINE AGAINST THE RABBIT VIRAL HEMORRHAGIC

Eremin D.V.<sup>1,2</sup>, Panov A.V.<sup>1,2</sup>, Kochkina Ju.V.<sup>1,2</sup>, Selyaninov Y.O.<sup>3</sup>, Zubairov M.M.<sup>3</sup>, Kedik S.A.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Moscow Technological University, Moscow.

<sup>2</sup> ZAO «Institute of pharmaceutical technologies», Moscow.

<sup>3</sup> State Science Institution National Research Institute of Veterinary Virology and Microbiology of Russian Academy of Agricultural Sciences

**В**спышки вирусной геморрагической болезни кроликов (ВГБК) регулярно регистрируются по всему миру [1]. Эпизоотология ВГБК характеризуется высокой контагиозностью и 80-100% летальностью, при этом болезнь в основном протекает в острой и сверхострой форме, без проявления клинических признаков до начала агонального периода [2]. Трудности в диагностике данного заболевания и отсутствие препаратов, способных эффективно бороться с возбудителем у заражённого животного, делают вопросы профилактики ВГБК особенно актуальными для животноводства.

Основными методами предупреждения распространения ВГБК является массовая вакцинация животных [3,4]. Однако известные к настоящему времени вакцины не позволяют сохранить 100% популяции животных в случае вспышки инфекции на животноводческом предприятии. Кроме того, эффективность существующих вакцин снижается вследствие изменения популяционной структуры вируса, что обуславливает необходимость поиска новых вакцин и способов повышения их активности.

В ходе проведённых исследований была изучена возможность повышения эффективности инактивированной вакцины путём комбинированного введения её с сополимером N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина, иммуноадьювантное действие которого показано ранее [5,6,7], определены оптимальные дозы сополимера и вакцины для формирования надежного иммунитета у животных против вирусной геморрагической болезни кроликов.

**Материалы и методы исследований** Для приведения исследований использовали: сухую инактивированную вакцину против вирусной геморрагической болезни кроликов (ВГБК), производства ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии; сополимер N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина, полученный радикальной сополимеризацией при поддержании постоянства мономерного состава реакционной массы и очищенный методом ультрафильтрации [7,8,9]. В качестве основного объекта исследования был выбран водорастворимый образец сополимера [10] с содержанием звеньев 2-метил-5-винилпиридина 35 мол.% и средневискозиметрической

молекулярной массой 27 кДа; Вирулентный вирус ГБК штамм «В-87», инфекционная активность не менее  $10^{3,0}$  ЛД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> или активность в РГА 1/256 и выше.

В качестве подопытных животных использовались кролики породы «шиншилла» массой  $3,0 \pm 0,5$  кг в количестве 28 голов. Предварительно у 10% кроликов брали кровь и сыворотку для определения реакции задержки гемагглютинации (РЗА) на наличие антител к возбудителю ВГБК.

Для оценки влияния сополимера на сроки формирования защиты (иммунитета) при заражении вирусной геморрагической болезнью кроликов содержимое 10 ампул (флаконов) с вакциной растворяли в стерильной дистиллированной воде или физиологическом растворе в количестве, равном количеству до лиофилизации. Готовили 6 групп кроликов по 4 головы в каждой и 4 головы использовали для контроля вирулентности вируса. Препарат и вакцину вводили однократно внутримышечно в область внутренней стороны бедра кролика в объеме 0,5 см<sup>3</sup>. Схема введения для 1 и 2 группы кроликов включала только вакцину в разведении 1:50 и 1:100 соответственно. Разведённая 1:50 вакцина для 3 и 4 группы кроликов содержала 50 и 150 мкг/кг сополимера соответственно. Препарат, вводимый 5 и 6 группе кроликов, содержал 50 и 150 мкг/кг сополимера соответственно при разведении вакцины 1:100. Контрольную группу из 4 кроликов оставляли не привитыми и содержали отдельно.

На 7, 14 и 21 сутки у кроликов 1 – 6 групп брали пробы крови и в сыворотках определяли наличие специфических к вирусу ВГБК антител в РЗА.

Через 21 день после иммунизации животных всех групп заражали внутримышечно в область внутренней поверхности бедра по 1,0 см<sup>3</sup> вирулентным вирусом ГБК в дозе 1000 ЛД<sub>50</sub>.

Для постановки реакции гемагглютинации (РГА) готовили общую пробу на физиологическом растворе и делали двукратные разведения вакцины от 1:2 до 1:4096. С этой целью во все лунки планшета одного ряда разливали физиологический раствор по 0,05 см<sup>3</sup>. В первую лунку планшета вносили равный объём вируса, трехкратно пипетировали и переносили 0,05 см<sup>3</sup> во вторую лунку и т.д. Из последней лунки удаляли 0,05 см<sup>3</sup> и обезвреживали в 2%-ном растворе ед-

кого натрия.

После разведения вируса во все лунки вносили 1% взвесь эритроцитов в объёме, равном исходному объёму физиологического раствора 0,05 см<sup>3</sup>. Планшеты встряхивали и оставляли при комнатной температуре 18-20°C. Учёт реакции проводят через 60-90 мин. Контролем эритроцитов на спонтанную гемагглютинацию служили две лунки с эритроцитами и физиологическим раствором (в равных объёмах). РГА оценивали положительно при оседании эритроцитов в виде хорошо выраженного «зонтика», а отрицательно – в виде «пуговки». За титр вируса принимают его наибольшее разведение, дающее четко выраженную агглютинацию в виде «зонтика».

Реакцию задержки гемагглютинации проводили в ряду лунок (по 10-12 лунок в ряду), внося по 0,025 см<sup>3</sup> физиологического раствора, затем добавляя в первые лунки по 0,025 см<sup>3</sup> испытуемые и контрольные (положительная и отрицательная) сыворотки, предварительно разведенные 1:2 и прогретые для инактивации термолабильных ингибиторов, и готовили их двукратные разведения, начиная с 1:4 до 1:9192. После этого вносили специфический антиген в рабочем разведении, содержащем 4 ГАЕ.

Одновременно ставили следующие контроли:

- контроль рабочего разведения специфического антигена на физиологическом растворе;
- контроль сывороток на наличие неспецифических гемагглютининов (в разведении от 1:4 до 1:256) на физиологическом растворе.

Пластины выдерживали в течение 1 часа при комнатной температуре или при 37°C, после чего вносили по 0,05 см<sup>3</sup> 1,0%-ной взвесь эритроцитов человека группы 0 (I) и ставили контроль на спонтанную агглютинацию эритроцитов (0,05 см<sup>3</sup> физиологического раствора + 0,05 см<sup>3</sup> эритроцитов). После 50-60 минут инкубации при комнатной температуре проводили учет результатов.

В контролях эритроцитов на спонтанную агглютинацию и контролях сывороток на наличие неспецифических гемагглютининов эритроциты должны оседать в виде точки или компактного кольца. В контроле рабочего разведения антигена агглютинация эритроцитов должна быть в виде «зонтика» в первых четырёх лунках.

Титром антител в сыворотках крови считали

наивысшее её разведение, которое даёт полную задержку гемагглютинации.

**Результаты исследований** Проведённые опыты *in vivo* показали, что использование комбинации сополимера N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина с инактивированной вакциной против вирусной геморрагической болезни кроликов существенно активировало иммунитет в сравнении с консервативным использованием вакцин. Как было показано ранее, что сополимер стимулирует как гуморальное, так и клеточное звено в организме, за счёт активации выработки интерлейкина-1 $\alpha$  и интерлейкина-1 $\beta$ , а также выброса в периферическую кровь клеточных элементов кроветворения [7,11].

Так в 1 и 2 группе животных, вакцинированных без сополимера, уровень вируснейтрализующих антител составлял 1:4 в реакции задержки гемагглютинации на 14 сутки и практически отсутствовал спустя три недели, что совпадало со значениями контрольной группы. Использование комбинации вакцины в разведении 1:50 с иммуностимулирующим препаратом повысило уровень антител до 1:16 даже на 21 сутки. При этом проверка активности иммунитета путём контрольного заражения кроликов вирулентным вирусом в дозе 1000 ЛД 50 на 21 сутки после вакцинации с сополимером в дозе 150 мкг/кг показала 100% выживаемость животных опытной 4 группы, по сравнению с 80-100% гибелью в остальных. Использование сополимера совместно с вакциной в большем разведении также позволило поднять уровень вируснейтрализующих антител до 1:4 на 21 сутки у 50% особей в 5 и 6 группах.

Таким образом, используя различные комбинации сополимера N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина с инактивированной вакциной против вирусной геморрагической болезни кроликов, было показано, что активация иммунитета у кроликов была достигнута однократным введением вакцины в разведении 1:50 с сополимером в дозе 150 мкг/кг и предохраняла от гибели 100 % животных опытной группы.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Шевченко А.А. и др./ Вирусная геморрагическая болезнь кроликов // Ветеринария Кубани. 2014., № 5., С.11–17.

2. Новикова М.Б. и др. /Проблемы диагностики геморрагическая болезнь кроликов// Ветеринария Кубани. 2013. № 1. С.19–20.

3. Моргунов С.Ю., Луницын А.В., Моргунов Ю.П./ Некоторые особенности практического применения вакцинных препаратов против вирусной болезни кроликов// Кролиководство и звероводство. 2012. №3, С 29-30

4. Голубцов А.В., Кузьмин Г.Н., Лопатина В.Т., Лопатина Н.А. Иммуностимулятор «Миксоферон» в комплексе специфической профилактики вирусной геморрагической болезни кроликов// Ветеринарная патология. 2003. №1, С 109-111

5. Кедик С.А., Еремин Д.В., Панов А.В., Сакаева И.В., Кочкина (Черта) Ю.В., Суслов В.В./ Синтез, физико-химические свойства и биологическая активность физиологически активных сополимеров N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина 1.СИНТЕЗ И МОЛЕКУЛЯРНО-МАССОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ // Химико-фармацевтический журнал. 2012. Том 46, № 8, С 110-113

6. Кедик С.А., , Панов А.В., Сакаева И.В., Еремин Д.В., Кочкина (Черта) Ю.В., Суслов В.В., Зайцев М.А./ Синтез, физико-химические свойства и биологическая активность физиологически активных сополимеров N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина. 2. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ // Химико-фармацевтический журнал 2014.Том 47 №10 С 569-571

7. Патент РФ №2430932 (2010)

8. Патент на полезную модель РФ №110743 (2011)

9. Патент на полезную модель РФ №110744 (2011)

10 Кедик С.А., , Панов А.В., Суслов В.В., Еремин Д.В., Кочкина (Черта) Ю.В., Малиновская Г.О./ Влияние различных факторов на растворимость сополимеров N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина в воде // Химико-фармацевтический журнал 2013.Том 47 №2 С 99-101

11. Панов А.В., Измestьева О.С., Селиванова Е.И. и др., / Гемопоэтические показатели при остром облучении мышей, подвергнутых терапии сополимером N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина // Радиация и риск, Том 25 №1, 65-75 (2016).