

ПОВЫШЕНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКИ НА ОСНОВЕ МАСЛЯНЫХ АДЬЮВАНТОВ

Скупневский С.В.,

Пушаева Е.Г.,

Бадтиев А.К.,

Руруа Ф.К.,

Батагова Ф.Э.,

Фарниева Ж.Г.

Институт биомедицинских исследований – филиал ФГБУН ФНЦ
Владикавказский научный центр РАН, Владикавказ, Россия

IMPROVING SAFETY OF OIL ADJUVANT-BASED VACCINES

Skupnevskii S.V.,

Pukhaeva E.G.,

Badtiev A.K.,

Rurua F.K.,

Batagova F.E.,

Farnieva ZH.G.

Institute of Biomedical Investigations - the Affiliate of Vladikavkaz Scientific
Centre of RAS, Vladikavkaz, RNO-Alania, Russian Federation

Резюме. Ограничением повышению эффективности вакцинотерапии служит высокая реактогенность адъювантов. **Цель** работы – снижение иммунотоксических эффектов, обусловленных введением полного адъюванта Фрейнда (ПАФ) теплокровным. **Материалы и методы.** Объект исследования крысы *Wistar*. Негативный контроль (растворители); позитивный контроль (однократное подкожное введение ПАФ 0,1 мл/200 г массы тела (м.т.)); опыт «минимально» и опыт «максимально» (*per os* лимонная и янтарная кислоты (1:4) в соотношении 17 и 88 мг/кг м.т. – 4 недели после иммунизации ПАФ). Массу тела, гематологические и биохимические (гидроперекиси, малоновый диальдегид (МДА), активность каталазы, дегидрогеназная активность митохондрий) показатели изучали в динамике. По окончании эксперимента осуществлена некропсия и расчет массовых коэффициентов органов. Селезенку и соединительную ткань (коленный сустав) изучали гистологически. Рассчитывали медиану, C_{25} – C_{75} квартили, *U*-критерий Манна-Уитни.

Результаты и их обсуждение. Для животных негативного контроля исследуемые параметры колебались в пределах нормы. Иммунизация теплокровных ПАФ сопровождалась переходом острой воспалительной реакции (3-я неделя) в хроническую (7-я неделя). Общее количество лейкоцитов повышалось с $12,5 \cdot 10^9$ (негативный контроль) до $26,6 \cdot 10^9$ /л ($P=0,01$) на 3-й неделе и затем снижалось до $19,2 \cdot 10^9$ /л ($P=0,01$) к 7-й. Столь же значимо возрастали тромбоциты: с $506 \cdot 10^9$ (негативный контроль) до $656 \cdot 10^9$ /л ($P=0,01$, 3-я неделя) с последующим снижением до $610 \cdot 10^9$ /л к 7-й ($P=0,01$). Активация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) проявилась увеличением МДА на 55,8–61,8 % ($P=0,01$); общетоксическое действие ПАФ сказалось 11,7 % снижением массы тела ($P=0,01$), отечностью селезенки и редуцированием тимуса. Введение антиоксидантов привело к дозозависимому снижению воспалительной реакции (лейкоциты в минимальной дозировке $19,6 \cdot 10^9$ – $20,9 \cdot 10^9$ /л; в максимальной $16,6 \cdot 10^9$ –

16,0·10⁹/л), нормализации индекса «тромбоциты/лейкоциты» до 29,5-36,3 (позитивный контроль 24,6, негативный 40,5). Защитное действие кислот проявилось сохранением массы тела, активацией каталазы и ингибированием ПОЛ. На тканевом уровне выявлено купирование дегенеративных изменений в селезенке и соединительной ткани: уменьшение очагов кровоизлияний, отечности и сохранение гистоархитектоники.

Заключение. Использование лимонной и янтарной кислот способствует снижению токсичности масляного адьюванта Фрейнда за счет повышения антиоксидантного статуса, ингибирования процессов липопероксидации, усиления метаболической активности митохондрий, снижения общего системного воспаления, что позволяет рекомендовать кислоты в качестве протекторов иммунотоксических эффектов адьювантов.

Ключевые слова: вакцинотерапия; иммунотоксический эффект; лимонная кислота; масляные адьюванты; патология соединительной ткани; полный адьювант Фрейнда; янтарная кислота.

Abstract. High adjuvant reactogenicity is the main limitation for increasing the effectiveness of vaccine therapy. **The aim** was to reduce the immunotoxicity effects of complete Freund's adjuvant (CFA) in warm-blooded animals. **Materials and methods.** The study examined *Wistar* rats by dividing animals into negative control (solvents); positive control (single subcutaneous CFA injection of 0.1 ml / 200 g body weight (b.w.)); the "minimum" and "maximum" (*per os* administration of 1:4 citric and succinic acids in ratio of 17 and 88 mg/kg b.w. during 4 weeks after immunization of CFA) experiment. Body weight, hematological (complete blood count) and biochemical (hydroperoxides, malondialdehyde, catalase activity, mitochondrial dehydrogenase activity) parameters were dynamically investigated. At the end of the experiment, necropsy was performed and the relative internal organ mass coefficients were calculated. The spleen and connective tissue (knee

joint) were examined histologically. The median, C_{25} – C_{75} quartiles, Mann-Whitney U -test were calculated.

Results and its discussion. It was found that parameters examined were within normal range in animals of negative control group. Immunization of warm-blooded animals with CFA was accompanied by transition of acute-to-chronic inflammatory reaction (week 3 and week 7, respectively). The total leukocyte count increased from $12.5 \cdot 10^9$ (negative control) up to $26.6 \cdot 10^9/L$ ($P=0.01$) on week 3 followed by its decline down to $19.2 \cdot 10^9/L$ ($P=0.01$) by week 7. Platelet count also increased significantly: from $506 \cdot 10^9$ (negative control) up to $656 \cdot 10^9/L$ ($P=0.01$, week 3) followed by decrease down to $610 \cdot 10^9/L$ by week 7 ($P=0.01$). Activation of lipid peroxidation was manifested by malondialdehyde (MDA) level elevated by 55.8–61.8% ($P=0.01$); the general CFA-related toxic effect resulted in 11.7% weight loss ($P=0.01$), spleen swelling and thymus reduction. Administration of antioxidant acids led to a dose-dependent decline in inflammation (leukocyte count at the minimum dosage – $19.6 \cdot 10^9$ – $20.9 \cdot 10^9/L$; at the maximum $16.6 \cdot 10^9$ – $16.0 \cdot 10^9/L$), as well as normalized the "platelet/leukocyte" index up to 29.5–36.3 (positive control 24.6, negative control 40.5). The acid-related protective effect was also manifested as maintained body weight, activated catalase and inhibited lipid peroxidation. The therapeutic effect in alleviated degenerative changes in the spleen and connective tissue were revealed: reduced hemorrhagic focuses and swelling as well as preserved histoarchitectonics.

Conclusion. The use of citric and succinic acids contributes to profoundly lowered CFA toxicity due to increased total antioxidant status, inhibited lipid peroxidation, improved mitochondrial metabolic activity, which ultimately lead to a decline in general systemic inflammation and allows to recommend such acids as immunoprotectors from oil adjuvant-coupled effects.

Key words: complete Freund's adjuvant; connective tissue pathology; vaccine therapy; immunotoxic effect; lemon acid; oil adjuvants; succinic acid.

1 **Введение.** В фундаментальной монографии по вакцинотерапии [20] S.
2 Plotkin отмечает, что влияние вакцинации на здоровье людей в мировом
3 масштабе огромно: за исключением улучшения качества питьевой воды,
4 ничто другое не способствовало столь значительному снижению смертности
5 и росту населения планеты, – включая антибиотики. По экспертным оценкам,
6 благодаря вакцинации во всем мире ежегодно удается предотвратить порядка
7 6 млн. смертей, сохранить 386 млн. лет жизни и 96 млн. лет,
8 скорректированных по индексу нетрудоспособности DALY [17]. Повышение
9 эффективности и безопасности современных вакцин напрямую связано с
10 успехами в области разработки адъювантных технологий, которые берут свое
11 начало с 1916 г., когда авторами работы [12] впервые было установлено, что
12 эмульсия минеральных масел может значительным образом усиливать
13 иммунный ответ организма на вводимый антиген. Дальнейшие эксперименты
14 по иммунизации животных позволили выявить адъювантные свойства у
15 целого ряда химических соединений и сформулировать общие теоретические
16 принципы их функционирования. В настоящее время эти знания легли в
17 основу классификации адъювантов по механизму действия: активные
18 иммуностимуляторы (оказывают непосредственное воздействие на
19 антигенпрезентирующие клетки), системы доставки (осуществляют
20 депонирование, адресную доставку и модификацию антигена),
21 комбинированные адъюванты (т.н. адъюванты нового поколения,
22 призванные сочетать в себе преимущества первых двух групп) [3]. Тем не
23 менее, характер иммунного ответа, видовые и индивидуальные особенности
24 организма, способы и схемы эффективной иммунизации до сих пор во
25 многом определяются эмпирически [1], а в каждую из трех указанных групп
26 могут входить адъюванты, различающиеся по своим физико-химическим
27 свойствам: минеральные, масляные, корпускулярные и комбинированные.

28 После солей алюминия, долгое время являвшихся единственным
29 общеупотребимым адьювантом, в последние десятилетия значительное
30 распространение при производстве вакцин получили масляные эмульсии,
31 которые применяются для профилактики сезонного и пандемического
32 гриппа, гепатита В, папилломавирусных инфекций, немелкоклеточного рака
33 легких и других широко распространенных заболеваний человека [15,13].
34 Применение эмульсий типа «масло в воде» и «вода в масле» оправдано также
35 в педиатрической практике [13], пациенты которой составляют одну из
36 наиболее уязвимых групп населения. Преимуществом масляных адьювантов
37 (МА) является медленное (в случае липосом – контролируемое)
38 высвобождение антигенов из депо, а также активация гуморального и
39 клеточного звеньев иммунной системы, что обуславливает их
40 эффективность. Основу молекулярно-клеточного механизма действия МА
41 составляет выделение в местах ввода вакцины молекулярных паттернов,
42 ассоциированных с повреждением собственных клеток организма.
43 Высвобождение аутологичных ДНК, РНК, полипептидов и др.
44 макромолекулярных фрагментов в результате дестабилизации клеточных
45 мембран, обусловленной в том числе и липофильными свойствами масляных
46 адьювантов [19,16.], обеспечивает потенцирующий эффект презентруемых
47 антигенов и определяет высокую биологическую активность вакцин на их
48 основе. Несмотря на достигнутые успехи в области создания вакцин на
49 основе МА, для них продолжают оставаться актуальными вопросы
50 купирования системной и локальной реактогенности.

51 **Целью** работы являлось снижение иммунотоксических эффектов,
52 обусловленных введением полного адьюванта Фрейнда теплокровным
53 животным.

54 **Материалы и методы исследований**

55 Исследования были проведены на крысах-самцах линии *Wistar* ($n=32$) с
56 массой тела 420 ± 20 г в возрасте 24 месяца, полученных из ФГУП «Питомник
57 лабораторных животных «Рапполово», Ленинградская область. Условия
58 содержания животных отвечали стандартам, предъявляемым для вивариев¹.
59 Световой режим в помещениях для содержания животных был 12:12; доступ
60 к воде – свободный. На период введения тестируемых веществ (смеси
61 лимонной и янтарной кислот) с кормом осуществлялась пищевая депривация
62 животных – кормление проводилось после полного потребления затравки,
63 равномерно распределенной в кормовой смеси.

64 При работе с грызунами придерживались правил и этических норм,
65 описанных в «Европейской конвенции о защите позвоночных животных,
66 используемых для экспериментов или в иных научных целях» (Страсбург, 18
67 марта 1986 года) и с разрешения этического комитета при Институте
68 биомедицинских исследований РАН. В конце эксперимента эвтаназию крыс
69 осуществляли в CO₂-затравочном боксе.

70 *Дизайн эксперимента.* Животные были разделены на четыре равные
71 группы. Манипуляции по введению растворов и отбору крови проводились
72 под легким общим наркозом (Золетил, Франция). Крысам первой группы
73 (негативный контроль) подкожно вводили изотонический раствор натрия
74 хлорида в объеме 0,1 мл на 200 г м.т. Иммунизацию крыс второй группы
75 (позитивный контроль) осуществляли подкожным введением полного
76 адьюванта Фрейнда в объеме 0,1 мл на 200 г м.т. (Freund's Complete Adjuvant,
77 Difco Laboratories (США)). Животным третьей и четвертой групп («Опыт
78 минимально (мин.)», «Опыт максимально (макс.)», соответственно) после
79 однократного подкожного введения ПАФ в объеме 0,1 мл на 200 г м.т.
80 осуществляли профилактику иммунотоксического действия смесью
81 лимонной и янтарной кислот, взятых в массовом соотношении 1:4. Для этого

¹ ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур»

82 карбоновые кислоты предварительно нейтрализовывали минеральной водой
83 до рН 7,0-7,5 и полученным раствором равномерно смачивали
84 экструдированные гранулы, которые после просушивания скармливали
85 животным. Введение антиоксидантов осуществляли на протяжении 4 недель
86 в дозировках 17 мг/кг (мин.) м.т. и 88 мг/кг (макс.) м.т. После этого
87 животных переводили на стандартный рацион и режим питания.

88 По истечении 3-х и 7-ми недель у животных из сердца отбирали кровь
89 для гематологических и биохимических исследований.

90 *Методики проведения исследований.* Измерение массы тела животных
91 проводили в динамике с интервалами в 2-3 недели. По окончании
92 эксперимента осуществляли necropsию и измерение массы внутренних
93 органов; на основании полученных результатов рассчитывали массовые
94 коэффициенты внутренних органов (г/кг массы тела). Гематологические
95 показатели определяли с помощью автоматического гематологического
96 анализатора Mythic 22 (Польша), лейкоцитарную формулу для повышения
97 точности рассчитывали микроскопией мазка.

98 Содержание гидроперекисей (ГП) в плазме крови определяли по
99 Гаврилову, используя наборы фирмы ООО «Агат-Мед» (Россия). В отмытых
100 холодным изотоническим раствором эритроцитах измеряли стандартным
101 методом содержание малонового диальдегида по реакции с тиобарбитуровой
102 кислотой [2]. Активность каталазы в гемолизованных эритроцитах
103 измеряли по методу T. Beutler [4] основанном на расчете кинетики распада
104 перекиси водорода по результатам спектрофотометрического анализа.

105 Для гистологических исследований образцы селезенки и
106 соединительной ткани (коленный сустав) помещали в нейтральный 10 %
107 раствор формалина и фиксировали не менее 72 часов. Парафиновые срезы
108 окрашивали гематоксилин-эозином и анализировали при увеличении 10x10 и
109 10x40.

110 Для анализа выборок рассчитывали медиану (Me), 25-й и 75-й
111 процентиля (C_{25} – C_{75}). Выбор нулевой или альтернативной гипотез
112 осуществляли на основе U -критерия Манна-Уитни с помощью онлайн
113 калькулятора [10]. Значимыми считались различия при $P < 0,05$.

114 **Результаты**

115 Введение животным полного адьюванта Фрейнда приводит к срыву
116 иммунной толерантности и запуску каскада патологических процессов,
117 выявляемых на различных уровнях – от организменного до клеточного (табл.
118 1-5, рис. 1, 2). На основе анализа интегрального показателя – изменения
119 массы тела животных можно заключить, что гиперактивация иммунной
120 системы компонентами ПАФ приводит к общему дисбалансу в системе
121 пластического обмена и сопровождается снижением веса (табл. 1)

122 Таблица 1

123

124 В группе позитивного контроля к окончанию второй недели
125 статистически значимое (относительно негативного контроля) снижение
126 массы составило 9,1% и после относительной стабилизации в течение
127 последующих трех недель (5-я неделя) регистрируемый показатель
128 дополнительно снизился (к 7-й неделе). Итоговая потеря в весе составила
129 11,7 % относительно исходного значения. В условиях профилактического
130 воздействия смеси лимонной и янтарной кислот, вводимых в режиме «доза-
131 эффект», проявилась качественно иная закономерность: менее выраженное
132 (3,1-5,2%) снижение массы к окончанию второй недели и затем ее 2,6-3,4 %
133 прирост в период введения антиоксидантов (пятая неделя). Последующая
134 отмена антиоксидантов приводит к повторному снижению массы на 3,0-3,6
135 %, что в сумме дает ее конечное уменьшение от исходного уровня на 2,7-6,25

136 % (при существенном (до 9 %) прибавлении на фоне животных позитивного
137 контроля).

138 У животных из группы негативного контроля отмечен стабильный
139 прирост массы в соответствии с физиологическими закономерностями,
140 характерными их возрасту [9].

141 По окончании эксперимента в результате некропии значимых
142 аномалий в топографии, структуре, форме и цвете органов у животных
143 опытных и контрольных групп не выявлено. Изучение индексов массы
144 внутренних органов (относительно массы тела) позволило вскрыть
145 отдельные патологические изменения, затронувшие организм животных,
146 подвергнутых воздействию адьюванта Фрейнда (табл. 2).

147 Таблица 2

148

149 Из таблицы видно, что статистически значимые изменения у животных
150 из группы позитивного контроля выявляются прежде всего в органах
151 иммунной системы – селезенке и вилочковой железе. При этом
152 относительная масса селезенки увеличилась на 25,3 %, а тимус, наоборот,
153 оказался редуцирован на 37,0 %. Протективное действие карбоновых кислот
154 в максимальной дозировке проявилось сохранением лимфоэпителиального
155 органа с коэффициентом защиты 25 % (относительно позитивного контроля),
156 а расчеты по критерию Манна-Уитни показали, что массив полученных
157 данных составляет единую выборку с животными негативного контроля.

158 Ключевые гематологические показатели теплокровных представлены в
159 таблице 3.

160 Таблица 3

161

162 Из таблицы видно, что в ходе проведения общего клинического
163 анализа крови у животных негативного контроля исследуемые параметры
164 изменяются незначительно и остаются в пределах колебаний нормы [21].
165 После введения ПАФ у теплокровных отмечается острая воспалительная
166 реакция, выявляемая повышением уровня лейкоцитов. Так, в группе
167 позитивного контроля общее количество клеток белой крови на третьей
168 неделе эксперимента увеличилось относительно негативного контроля в 2,1
169 раз (статистически значимо). В условиях профилактики карбоновыми
170 кислотами степень лейкоцитоза статистически значимо и дозозависимо
171 снижается: с минимальной концентрацией на 26,3 %, с максимальной – на
172 37,6 %. При этом также отмечается другая положительная тенденция –
173 сужение размаха выборки: в первом случае (опыт «мин.») разница между
174 верхним и нижним квартилями составляет 64 %, а во втором – не превышает
175 40 % (опыт «макс.»).

176 К окончанию всего эксперимента (7-я неделя) степень выраженности
177 воспалительных реакций у крыс из группы позитивного контроля снижается
178 на 27,8 %, у опытных животных на фоне изначального купирования
179 лейкоцитоза существенных колебаний общей численности клеток белой
180 крови не выявлено.

181 Состояние системы эритропоэза в условиях проводимого эксперимента
182 остается достаточно стабильным: у всех животных общее количество
183 эритроцитов и содержание в них гемоглобина колеблется незначительно и
184 сохраняется в пределах нормы.

185 В мегакариоцитарном ростке в условиях иммунизации ПАФ
186 отмечаются статистически значимые патологические сдвиги: количество
187 тромбоцитов относительно животных негативного контроля оказывается
188 повышенным на 20,6–29,6 %. Коррекция тромбоцитоза на фоне приема

189 антиоксидантов способствовала 9,8–11,7 %-ному снижению содержания
190 кровяных пластинок даже при минимальной дозировке.

191 О протективном действии карбоновых кислот в отношении ПАФ-
192 индуцированного воспаления свидетельствуют также расчеты отношения
193 «тромбоциты/лейкоциты» (Т/Л). Для животных негативного контроля
194 данный параметр колеблется незначительно и сохраняется в пределах 39,5–
195 40,6. На фоне введения ПАФ (позитивный контроль) к третьей неделе
196 отношение Т/Л значительно снижается, достигая значения 24,6, а к седьмой
197 неделе – 31,8. Наиболее выраженное защитное действие антиоксидантов
198 проявилось в максимальной дозировке, способствуя поддержанию
199 рассчитываемого индекса в пределах 35,3–36,3.

200 Воздействие ПАФ и антиоксидантов на отдельные субпопуляции
201 лейкоцитов отражено в таблице 4.

202 Таблица 4

203

204 Согласно полученным результатам, регистрируемые колебания в
205 показателях крови у крыс негативного контроля незначительны и не выходят
206 за границы нормы [18]. При иммунизации животных в лейкоцитарной
207 формуле выявляются определенные сдвиги, затрагивающие
208 преимущественно лимфобластный и миелобластный ростки крови. Так, у
209 крыс позитивного контроля статистически значимые изменения отмечаются
210 на 7-й неделе: относительное содержание зрелых нейтрофилов снижается на
211 7 % (относительно негативного контроля), а лимфоцитов – повышается на
212 12,5 %. Воздействие карбоновых кислот на лейкопоз носит дозозависимый
213 характер и проявляется по-разному: нейтропения (и соответственно
214 лимфоцитоз) при сравнении с позитивным контролем у опытных животных с

215 минимальной концентрацией на третьей неделе, а с максимальной – на
216 седьмой.

217 В других клеточных звеньях системы лейкона существенных различий
218 между сравниваемыми группами не выявлено.

219 Изменения, затронувшие систему перекисного окисления липидов и
220 общую дыхательную (дегидрогеназную) активность лимфоцитов в условиях
221 коррекции аутоиммунных реакций карбоновыми кислотами, отражены в
222 таблице 5.

223 Таблица 5

224

225 Из таблицы видно, что существенных изменений в содержании
226 первичных продуктов ПОЛ – гидроперекисей не отмечается. Единственным
227 значимым событием явилось 15 %-ое увеличение ГП в плазме животных
228 опытной группы с максимальной дозировкой антиоксидантов к 7-й неделе
229 (при сравнении с группой позитивного контроля). Уровень вторичных
230 продуктов ПОЛ, в виде маркера – МДА, изменился статистически значимо у
231 всех экспериментальных животных, затравленных ПАФ. Так, в группе
232 позитивного контроля содержание МДА при сравнении «негативный /
233 позитивный» контроли возросло на 55,8–61,8 %. Введение органических
234 кислот даже в минимальной дозировке способствовало снижению
235 интенсивности реакций окислительной деструкции мембран на 11,2–16,8 %
236 ($P = 0,01–0,05$).

237 Анализ каталазной активности позволяет заключить, что иммунизация
238 адьювантом привела к компенсаторному увеличению ферментного звена
239 системы антиоксидантной защиты. Уже к третьей неделе оцениваемый
240 параметр у теплокровных из группы позитивного контроля возрос на 9,8 %
241 (статистически значимо). Смесь лимонной и янтарной кислот позволила еще

242 более повысить эффективность антирадикальной защиты, способствуя росту
243 энзиматической активности каталазы на 1,4–4,1 % к третьей неделе с
244 момента антигенной стимуляции и на 7,8–12,2 % (статистически значимо) к
245 окончанию эксперимента.

246 Наиболее существенные изменения в дегидрогеназной активности
247 митохондрий лимфоцитов отмечены к 7-й неделе: у животных из группы
248 позитивного контроля регистрируемый параметр статистически значимо
249 уменьшился в 2,8 раза (в сравнении с негативным контролем); введение
250 антиоксидантов – субстратов цикла трикарбоновых кислот позволило
251 повысить общую дыхательную активность иммунокомпетентных клеток на
252 43,1-46,9 %.

253 Изменения на клеточном уровне, обусловленные воздействием ПАФ и
254 карбоновых кислот на ткани селезенки, представлены на рисунке 1.

255

256 Рис. 1.

257

258 Гистоархитектоника селезенки животных из группы негативного
259 контроля (рис. 1 а) не нарушена, в отдельных случаях отмечается венозное
260 полнокровие. У животных позитивного контроля отмечены следующие
261 дегенеративные изменения в ткани: в красной пульпе очаги кровоизлияний с
262 гемосидерозом, в ряде случаев по всей плоскости среза; синусы расширены.
263 Сосудистая стенка артерий и вен в состоянии отека. Отмечается уменьшение
264 общей площади лимфоидных узелков, просветление герменативных центров,
265 частичное или полное стирание границ между зонами мантии, маргинальной
266 зоной и красной пульпой, расширение межклеточных щелей. В
267 лимфатических узелках и в красной пульпе нарушена структура
268 ретикулярной сети с разрывами, расслоением и фрагментацией волокон. На

269 фоне воздействия смеси лимонной и янтарной кислот (рис. 1 в, г) степень
270 дегенеративных изменений снижается: краевая и мантийная зоны четко
271 очерчены, площадь лимфоидных узелков приближена к норме. Синусоиды
272 расширены; отмечаются редкие и мелкофокальные очаги кровоизлияний,
273 количество которых в группе с максимальной дозировкой незначительно.

274 Одним из проявлений иммунотоксического действия ПАФ является
275 индуцированная патология соединительной ткани и, как следствие, развитие
276 аутоиммунного ревматоидного артрита [14]. Морфологические исследования
277 суставного аппарата животных модельной группы (позитивный контроль)
278 охарактеризованы изменениями различной степени тяжести (рис. 2).

279

280 Рис. 2.

281

282 На фоне введения ПАФ (рис. 2 б) у животных отмечается
283 пролиферация синовиоцитов, гиперплазия, отечность и утолщение слоев в
284 синовиальной оболочке. В строме выявляются множественные очаги
285 периваскулярного инфильтрата, представленного преимущественно
286 лимфоцитами. Морфологическая картина надхрящницы свидетельствует о
287 признаках дезорганизации соединительной ткани в виде истончения и
288 разволокнения наружного и внутреннего слоев. При этом в наружном слое
289 рыхлой волокнистой соединительной ткани характерным является умеренно
290 выраженный периваскулярный отек, отмечаются единичные лимфоциты в
291 сосудистой стенке, а также фокусы кровоизлияний. Для внутреннего слоя
292 выявлены участки с относительным уменьшением клеточного состава. При
293 гистологическом исследовании суставных поверхностей гиалинового хряща
294 коленного сустава отмечаются дегенеративные изменения в виде истончения
295 поверхностного слоя молодых хондроцитов, варьирующие от слабой до

296 умеренной степени, очаговые кровоизлияния. В промежуточной зоне
297 изогенные группы хондроцитов с признаками дистрофических изменений и
298 усилением базофилии территориальных участков межклеточного вещества,
299 очаговая вакуолизация матрикса. В большинстве случаев в строении
300 субхондральной кости гистоархитектоника не нарушена, однако, в
301 единичных случаях отмечено истончение костной пластинки.

302 На фоне введения смеси лимонной и янтарной кислот (рис. 2 в, г)
303 общая степень дегенеративных изменений снижена. Это проявлялось
304 снижением степени отечности в синовиальной оболочке, уменьшением или
305 полным исчезновением очагов периваскулярного инфильтрата. Фиброзный и
306 камбиальный слой надхрящницы с незначительными признаками истончения
307 и разволокнения. Хондроциты гиалинового хряща крупные, овальной формы
308 и образуют изогенные группы, ориентированные перпендикулярно
309 поверхности хряща.

310 **Обсуждение**

311 Полный адъювант Фрейнда, представляющий собой водно-масляную
312 эмульсию с термически инактивированными микобактериями туберкулеза,
313 широко используется в практике лабораторного эксперимента и продолжает
314 оставаться «золотым стандартом» в иммунологии [7]. Его введение
315 животным приводит к росту в крови моноаминов [22], выполняющих роль
316 медиаторов воспаления, и сопровождается высоким титром антител [8.].

317 Согласно полученным результатам, гиперэргическое воспаление в
318 ответ на введение ПАФ развивается к третьей неделе, после чего идет на спад
319 и к седьмой неделе приобретает характер хронического процесса. На фоне
320 смеси лимонной и янтарной кислот степень воспалительной реакции
321 дозозависимо снижается и при максимальной дозировке такие показатели
322 воспаления как уровень лейкоцитов и тромбоцитов становятся статистически
323 неразличимыми при сравнении с группой негативного контроля, а отношение

324 Т/Л приближается к норме, что, как указывается в работе [6], является
325 чувствительным и информативным маркером воспаления.

326 О снижении воспалительного процесса под действием антиоксидантов
327 позволяет заключить также нормализация содержания в крови малонового
328 диальдегида, повышенный уровень которого свидетельствует не только об
329 оксидативном стрессе, но и отражает интенсификацию воспалительных
330 реакций в организме [11].

331 Анализ ключевых параметров, диагностирующих общетоксическое
332 действие ПАФ, – динамика массы тела и массовые коэффициенты органов
333 также свидетельствует о модифицирующем эффекте карбоновых кислот,
334 особенно четко фиксируемом в максимальной дозировке действующих
335 веществ. В работе [5] отмечается, что потеря массы тела приводит к
336 снижению общего системного воспаления за счет уменьшения образования
337 провоспалительных цитокинов, сокращения объемов выработки активных
338 форм кислорода и увеличения эффективности энергетической
339 продуктивности митохондрий.

340 Относительная стабилизация массы тела животных, получавших смесь
341 лимонной и янтарной кислот на фоне ПАФ-индуцированной аутоиммунной
342 патологии, может раскрывать возможный саногенетический механизм
343 тестируемых веществ. Его основу составляют: непосредственный
344 антиоксидантный (мембранопротекторный) эффекты и повышение общей
345 дегидрогеназной активности митохондрий за счет участия цитрат- и
346 сукцинат-ионов в цикле Кребса. На тканевом уровне защитное действие
347 проявилось сохранением площади и структуры лимфатических фолликулов
348 селезенки на фоне очаговой или тотальной делимфатизации в условиях ПАФ
349 (позитивный контроль), а также значительным купированием признаков
350 дегенеративных изменений в базовых элементах соединительной ткани:
351 суставном хряще и синовиальной оболочке.

352 **Заключение**

353 Использование смеси лимонной и янтарной кислот позволяет
354 существенным образом снизить токсические проявления полного адъюванта
355 Фрейнда за счет повышения антиоксидантного статуса, ингибирования
356 процессов липопероксидации, усиления метаболической активности
357 митохондрий, что в конечном счете приводит к снижению общего
358 системного воспаления и способствует сохранению гистоархитектоники
359 органов-мишеней: селезенки и соединительной ткани.

РИСУНКИ

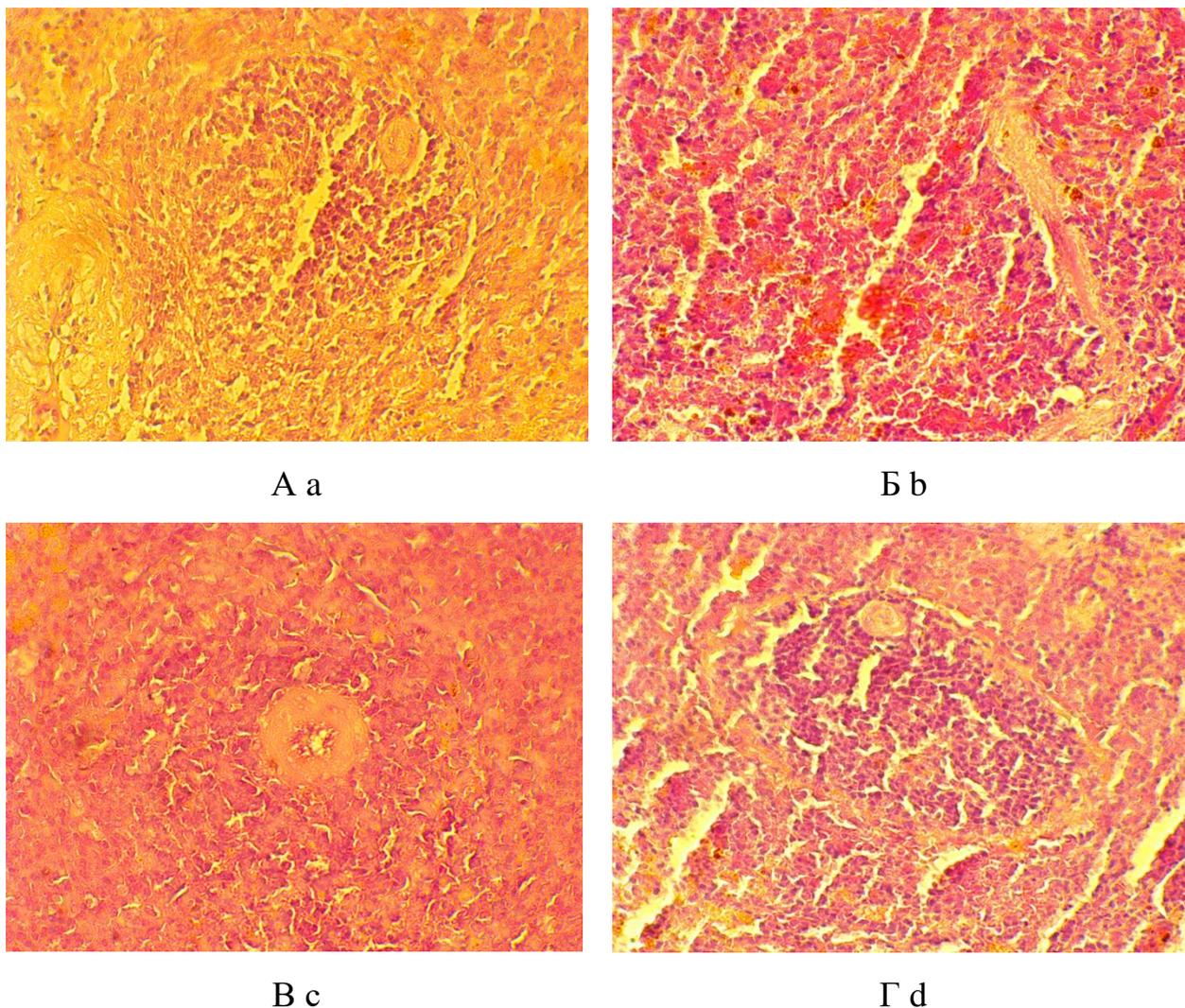


Рисунок. 1. Микрофотографии селезенки крыс (увеличение 10x40): А) негативный контроль; Б) позитивный контроль; В) опыт «мин.»; Г) опыт «макс.»

Figure. 1. rat spleen histology microimages (magnification 10x40): a) negative control; b) positive control; c) "min." experiment; d) "max." experiment.

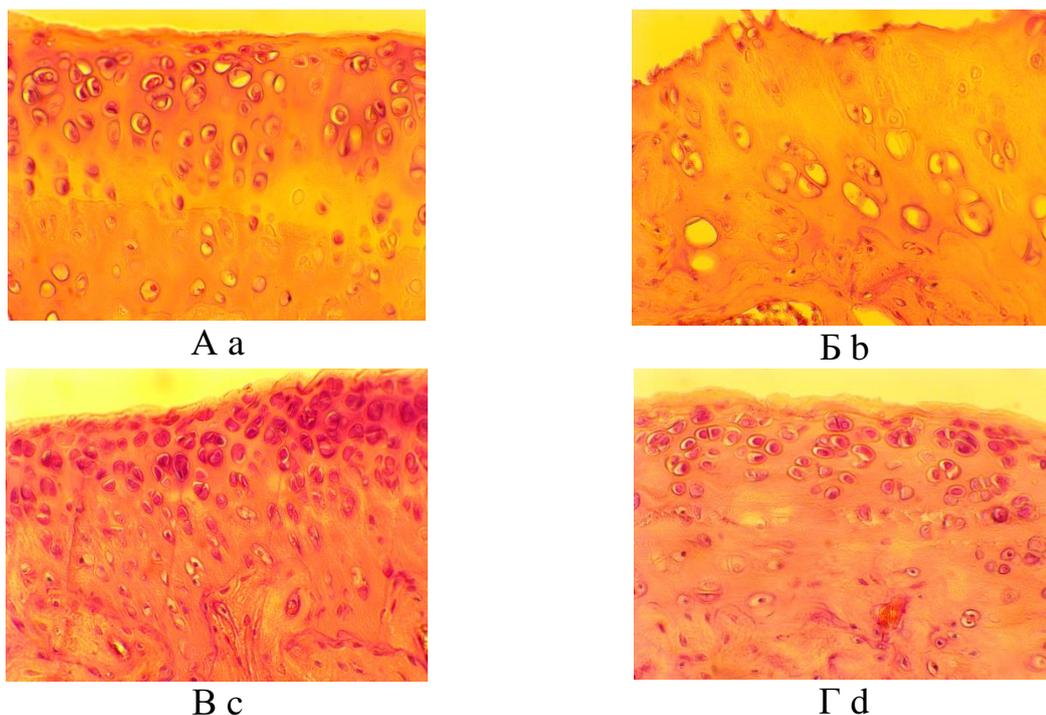


Рисунок. 2. Микрофотографии суставного хряща зоны коленного сустава крыс (увеличение 10x40): А) – негативный контроль; Б) – позитивный контроль; В) – опыт «мин.»; Г) – опыт «макс.»

Figure. 2. microimages of rat knee articular cartilage (magnification 10x40): a) – negative control; b) - positive control; c) - "min." experiment; d) - "max." experiment.

ТАБЛИЦЫ

Таблица 1. Динамика показателей массы тела у крыс

Table 1. Dynamics of body weight in rats

Группы животных Groups of animals	Стат. критерии Stat. criteria	Сроки обследования (в неделях) timepoints of examination (weeks)			
		0	2	5	7
Негативный контроль Negative control	Me	467,50	475,00	482,50	490,00
	C ₂₅ -C ₇₅	430,00-500,00	438,75-498,75	450,00-501,25	465,00-506,25
Позитивный контроль Positive control	Me	461,88	419,06	419,06	407,67
	C ₂₅ -C ₇₅	447,76-470,99	398,56-448,67	408,81-456,64	397,42-446,39
	P*	н/д ID	0,05	0,05	0,01
Опыт «мин.» "min." experiment	Me	444,00	430,50	445,00	432,50
	C ₂₅ -C ₇₅	429,25-508,50	411,50-470,00	422,50-487,50	396,25-456,25
	P**	н/д ID	н/д ID	н/д ID	н/д ID
Опыт «макс.» "max." experiment	Me	480,00	455,00	467,50	450,00
	C ₂₅ -C ₇₅	452,50-521,25	420,00-482,50	440,00-491,25	428,75-472,50
	P***	н/д ID	н/д ID	н/д ID	н/д ID

* – позитивный контроль относительно негативного; ** – опытная «мин.» относительно позитивного контроля; *** – опытная «макс.» относительно позитивного контроля; н/д – недостоверные отличия

* – positive vs. negative control; ** – "min." experiment vs. positive control; *** – "max." experiment vs. positive control; ID – insignificant differences

Таблица 2. Массовые коэффициенты внутренних органов (г/кг массы тела) крыс

Table 2. The relative internal organ mass coefficients (g/kg body weight) in rats

Группы животных Groups of animals	Стат. критерии Stat. criteria	Масса тела, г Body weight, g	Печень Liver	Почки Kidney	Селезенка Spleen	Тимус Thymus
Негативный контроль Negative control	Me	490,00	38,05	6,39	2,13	1,62
	C ₂₅ -C ₇₅	465,00-506,25	36,02-40,06	5,52-7,05	1,97-2,43	1,32-1,71
Позитивный контроль Positive control	Me	407,67	36,70	6,29	2,67	1,02
	C ₂₅ -C ₇₅	397,42-446,39	34,19-37,44	6,22-6,53	2,49-2,69	0,95-1,17
	P*	0,01	н/д ID	н/д ID	0,01	0,01
Опыт «мин.» "min." experiment	Me	432,50	35,45	6,32	3,74	1,00
	C ₂₅ -C ₇₅	396,25-456,25	32,28-37,37	5,66-8,49	2,64-4,05	0,98-1,05
	P**	н/д ID	н/д ID	н/д ID	н/д ID	н/д ID
Опыт «макс.» "max." experiment	Me	450,00	36,97	5,93	2,22	1,25
	C ₂₅ -C ₇₅	428,75-472,5	35,67-41,16	5,54-6,01	1,78-2,73	1,18-1,43
	P***	н/д ID	н/д ID	0,05	н/д ID	0,05

Обозначения те же (см. табл. 1)

for legend see Table 1

Таблица 3. Динамика основных гематологических показателей у крыс

Table 3. Dynamics of major rat hematological parameters

Группы животных Groups of animals	Стат. критерии Stat. criteria	Лейкоциты ($\times 10^9/\text{л}$) White blood cells ($\times 10^9/\text{L}$)		Эритроциты ($\times 10^{12}/\text{л}$) Red blood cells ($\times 10^{12}/\text{L}$)		Гемоглобин (г/л) Hemoglobin (g/L)		Тромбоциты ($\times 10^9/\text{л}$) Platelets ($\times 10^9/\text{L}$)	
		3 нед. week 3	7 нед. week 7	3 нед. week 3	7 нед. week 7	3 нед. week 3	7 нед. week 7	3 нед. week 3	7 нед. week 7
		Нег. к-ль Neg. cont.	Me	12,5	13,2	8,5	9,2	145,0	147,5
	C ₂₅ -C ₇₅	11,8- 16,2	11,8- 14,4	8,1-8,9	9,0-9,5	142,2- 147,5	144,7- 151,5	474,0- 562,7	481,0- 573,5
Поз. к-ль Pos. cont.	Me	26,6	19,2	8,7	9,5	144,0	151,5	656,0	610,5
	C ₂₅ -C ₇₅	23,6- 30,9	17,8- 21,2	8,2-8,9	9,3-9,6	140,2- 147,0	149,7- 158,0	640,5- 700,5	591,0- 657,5
	P*	0,01	0,01	н/д ID	н/д ID	н/д ID	н/д ID	0,01	0,01
Опыт «мин.» "min." Exp.	Me	19,6	20,9	8,9	8,9	147,0	147,0	579,0	550,5
	C ₂₅ -C ₇₅	14,2- 23,3	16,9- 25,8	8,8-9,4	8,5-9,1	144,0- 149,0	140,8- 150,8	534,5- 629,5	470,8- 629,0
	P**	0,05	н/д ID	н/д ID	0,05	н/д ID	н/д ID	0,05	н/д ID
Опыт «макс.» "max." Exp.	Me	16,6	16,0	9,3	9,5	149,5	155,0	603,5	567,5
	C ₂₅ -C ₇₅	14,3- 19,9	14,9- 16,1	8,7-9,5	9,4-9,8	142,8- 153,7	148,8- 159,2	513,5- 665,0	494,3- 645,8
	P***	0,01	0,01	н/д ID	н/д ID	н/д ID	н/д ID	н/д ID	н/д ID

Обозначения те же (см. табл. 1)

for legend see Table 1

Таблица 4. Лейкоцитарная формула экспериментальных животных

Table 4. Leukocyte count in experimental animals

Группы животных Groups of animals	Стат. критерии и Stat. criteria	П/я нейтрофилы (%) Band cells		С/я нейтрофилы (%) Segmented neutrophils		Эозинофилы (%) Eosinophils		Лимфоциты (%) Lymphocytes		Моноциты (%) Monocytes	
		3 нед. 3 weeks	7 нед. 7 weeks	3 нед. 3 weeks	7 нед. 7 weeks	3 нед. 3 weeks	7 нед. 7 weeks	3 нед. 3 weeks	7 нед. 7 weeks	3 нед. 3 weeks	7 нед. 7 weeks
Нег. к-ль Neg. cont.	Me	2,00	1,5	22,00	26,00	4,00	2,00	67,5	62,50	4,00	5,00
	C ₂₅ -C ₇₅	1,75-3,25	0-2,25	20,5-24,25	22,50-28,25	2,00-5,25	2,00-5,25	62,75-69,25	59,00-67,75	2,75-5,00	4,75-6,00
Поз. к-ль Pos. cont.	Me	1,5	1	24,00	19,00	4,00	3,00	65,00	75,00	4,00	3,00
	C ₂₅ -C ₇₅	1-1,25	0-1	19,00-32,50	16,25-20,00	0-6,25	2,75-4,00	62,00-68,25	72,50-80,75	3,00-5,50	1,00-3,00
	P*	н/д ID	н/д ID	н/д ID	0,05	н/д ID	н/д ID	н/д ID	0,05	н/д ID	0,01
Опыт «мин.» "min." Exp.	Me	2,5	1,5	14,00	25,50	3,00	2,00	74,00	65,50	7,50	5,50
	C ₂₅ -C ₇₅	0-3,25	1-2,25	12,50-15,25	14,00-34,75	2,00-6,50	0-2,25	67,75-75,75	53,75-77,00	5,50-8,50	5,00-6,00
	P**	н/д ID	0,05	0,01	н/д ID	н/д ID	0,05	н/д ID	н/д ID	0,05	0,01
Опыт «макс.» "max." Exp.	Me	0,5	1	25,50	15,00	1,00	2,00	64,50	76,50	3,00	3,50
	C ₂₅ -C ₇₅	0-2,25	1-1	22,75-36,25	14,00-24,50	0,75-2,00	2,00-3,25	56,50-70,25	63,50-79,00	2,00-5,00	2,00-5,50
	P***	н/д ID	н/д ID	н/д ID	н/д ID	н/д ID	н/д ID	н/д ID	н/д ID	н/д ID	н/д ID

Обозначения те же (см. табл. 1)

for legend see Table 1

Таблица 5. Динамика биохимических показателей крови у крыс

Table 5. Dynamics of rat blood biochemical parameters

Группы животных х Groups of animals	Стат. критерии и Stat. criteria	Гидроперекиси (мкмоль/л) Hydroperoxides (μmol/L)		МДА (мкмоль/л) MDA (μmol/L)		Каталаза (×10 ⁴ МЕ/г Hb) Catalase (×10 ⁴ IU/g Hb)		Дегидрогеназная активность (y.e.) Dehydrogenase activity (c.u.)	
		3 нед. 3 weeks	7 нед. 7 weeks	3 нед. 3 weeks	7 нед. 7 weeks	3 нед. 3 weeks	7 нед. 7 weeks	3 нед. 3 weeks	7 нед. 7 weeks
		Нег. к-ль Neg. cont.	Me	4,79	5,09	30,45	28,97	3,99	5,15
	C ₂₅ -C ₇₅	4,62- 5,00	4,71- 6,41	28,97- 32,05	26,03- 29,55	3,69- 4,07	4,95- 5,58	4,56- 5,39	2,91- 3,78
Поз. к-ль Pos. cont.	Me	5,12	4,65	49,27	45,13	4,38	4,98	3,03	1,30
	C ₂₅ -C ₇₅	4,85- 5,39	4,57- 4,82	46,96- 50,79	44,42- 45,83	4,10- 4,52	4,75- 5,30	2,75- 3,15	1,09- 1,61
	P*	н/д ID	н/д ID	0,01	0,01	0,05	н/д ID	0,01	0,01
Опыт «мин.» "min." Exp.	Me	4,72	5,12	43,73	37,56	4,44	5,59	2,68	1,91
	C ₂₅ -C ₇₅	4,12- 5,29	4,72- 5,62	40,85- 44,68	35,90- 40,32	4,35- 4,53	5,52- 5,72	2,50- 3,76	1,77- 2,15
	P**	н/д ID	н/д ID	0,01	0,05	н/д ID	0,01	н/д ID	0,01
Опыт «макс.» "max." Exp.	Me	5,92	5,38	43,98	42,31	4,56	5,37	2,79	1,86
	C ₂₅ -C ₇₅	5,52- 6,15	4,99- 5,85	42,79- 44,86	40,26- 43,46	4,33- 4,78	5,01- 5,55	2,53- 3,09	1,70- 2,01
	P***	н/д ID	0,05	0,05	0,05	н/д ID	0,05	н/д ID	0,01

Обозначения те же (см. табл. 1)

for legend see Table 1

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

ПОВЫШЕНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКИ НА ОСНОВЕ МАСЛЯНЫХ АДЬЮВАНТОВ

IMPROVING THE SAFETY OF VACCINE WITH OIL ADJUVANTS

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Пухаева Елена Георгиевна - младший научный сотрудник Института биомедицинских исследований - филиал ФГБУН ФНЦ Владикавказский научный центр РАН (362025, РСО-Алания, г. Владикавказ, ул. Пушкинская, д. 47, e-mail: medgenetika435@yandex.ru; тел: +7(928) 491-16-91

Институт биомедицинских исследований – филиал ФГБУН ФНЦ Владикавказский научный центр РАН, Владикавказ, Россия

Блок 2. Информация об авторах

Скупневский С.В. – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник Института биомедицинских исследований - филиал ФГБУН ФНЦ Владикавказский научный центр РАН (362025, РСО-Алания, г. Владикавказ, ул. Пушкинская, д. 47, e-mail: dreammas@yandex.ru; тел: +7(988) 871-55-28, ORCID iD: <http://orcid.org/0000-0002-6233-5944>)

Skupnevskiy S.V. – Dr. Sci. (Biol.), Leading Researcher, Laboratory of Subcellular Structures, Department of Molecular and Cellular Mechanisms of Autoimmune Diseases, Institute of Biomedical Research, Affiliate of Vladikavkaz Scientific Center of the Russian Academy of Sciences; e-mail: dreammas@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6233-5944>

Пухаева Е.Г. (Владикавказ, Россия) – младший научный сотрудник Института биомедицинских исследований - филиал ФГБУН ФНЦ Владикавказский научный центр РАН (362025, РСО-Алания, г. Владикавказ, ул. Пушкинская, д. 47, e-mail: medgenetika435@yandex.ru; тел: +7(928) 491-16-91, ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-0850-2537>)

Pukhaeva E.G. – Junior Researcher, Laboratory of Subcellular Structures, Department of Molecular and Cellular Mechanisms of Autoimmune Diseases, Institute of Biomedical Research, Affiliate of Vladikavkaz Scientific Center of RAS; e-mail: medgenetika435@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0850-2537>

Бадтиев А.К. – кандидат биологических наук, научный сотрудник Института биомедицинских исследований - филиал ФГБУН ФНЦ Владикавказский научный центр РАН (362025, РСО-Алания, г. Владикавказ, ул. Пушкинская, д. 47, e-mail: abadatiev@yandex.ru; тел: + (918) 834-07-33, ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-5850-5173>)

Badtiev A.K. – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Subcellular Structures, Department of Molecular and Cellular Mechanisms of Autoimmune Diseases, Institute of Biomedical Research, Affiliate of Vladikavkaz Scientific Center of RAS; e-mail: abadatiev@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5850-5173>

Руря Ф.К. (Владикавказ, Россия) – младший научный сотрудник Института биомедицинских исследований - филиал ФГБУН ФНЦ Владикавказский научный центр РАН (362025, РСО-Алания, г. Владикавказ, ул. Пушкинская, д. 47, e-mail: medgenetika435@yandex.ru; тел: +7(961)822-14-23, ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-9424-0467>)

Rurua F.K. – Junior Researcher, Laboratory of Subcellular Structures, Department of Molecular and Cellular Mechanisms of Autoimmune Diseases, Institute of Biomedical Research, Affiliate of Vladikavkaz Scientific Center of RAS; e-mail:

Батагова Ф.Э. – младший научный сотрудник Института биомедицинских исследований - филиал ФГБУН ФНЦ Владикавказский научный центр РАН (362025, РСО-Алания, г. Владикавказ, ул. Пушкинская, д. 47, e-mail: anechca2003@mail.ru; тел: +7(963) 177-35-17, ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-9105-0350>)

Batagova F.E. – Junior Researcher, Laboratory of Subcellular Structures, Postgraduate of the Department of Molecular and Cellular Mechanisms of Autoimmune Diseases, Institute of Biomedical Research, Affiliate of Vladikavkaz Scientific Center of RAS; e-mail: anechca2003@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9105-0350>

Фарниева Ж.Г. – младший научный сотрудник Института биомедицинских исследований - филиал ФГБУН ФНЦ Владикавказский научный центр РАН (362025, РСО-Алания, г. Владикавказ, ул. Пушкинская, д. 47, e-mail: medgenetika435@yandex.ru; тел:+7(928) 481-14-27, ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-9154-4729>)

Farnieva Zh.G. – Junior Researcher, Laboratory of Subcellular Structures, Postgraduate of the Department of Molecular and Cellular Mechanisms of Autoimmune Diseases, Institute of Biomedical Research, Affiliate of Vladikavkaz Scientific Center of RAS; e-mail: medgenetika435@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9154-4729>

Институт биомедицинских исследований – филиал ФГБУН Федерального научного центра «Владикавказский научный центр РАН», г. Владикавказ, 362025

Institute of Biomedical Investigations - the Affiliate of Vladikavkaz Scientific Centre of RAS, Pushkinskaya str., 47, Vladikavkaz, RNO-Alania, 362025, Russian Federation

Блок 3. Метаданные статьи

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

Безопасность вакцинопрофилактики

The safety of vaccine

Ключевые слова: вакцинотерапия; иммунотоксический эффект; лимонная кислота; масляные адъюванты; патология соединительной ткани; полный адъювант Фрейнда; янтарная кислота.

Keywords: complete Freund's adjuvant; connective tissue pathology; vaccine therapy; immunotoxic effect; lemon acid; oil adjuvants; succinic acid.

Оригинальная статья

Количество страниц текста – 13, количество рисунков – 2, количество таблиц – 5.

10.03.2022

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи или ее doi.
1.	Козлов В.Г., Ожерелков С.В., Санин А.В., Кожевникова Т.Н. Адъюванты в современной медицине и ветеринарии // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2014. № 1. С. 91-102.	Kozlov V.G., Ozherelkov S.V., Sanin A.V., Kozhevnikova T.N. Adjuvants in modern medicine and veterinary. <i>Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.</i> 2014, no. 1. pp. 91-102.	URL: https://cyberleninka.ru/article/n/adyuvanty-v-sovremennoy-meditsine-i-veterinariii (дата обращения: 24.02.2022).
2	Методы клинических лабораторных исследований // Под ред. В.С. Камышникова. 8-е изд. М. : МЕДпресс-информ;	Methods of clinical	

	2016. 736 с.	laboratory research. Pod red. prof. V.S. Kamyshnikova. – 8- e izd. – M. : MEDpress-inform, 2016, 736 p. (In Russ.)	
3	Семакова А.П., Микшис Н.И. Адьювантные технологии в создании современных вакцин // Проблемы особо опасных инфекций. 2016. №2. С. 28-35.	Semakova A.P., Mikshis N.I. Adjuvant technologies in the creation of modern vaccines. Problems of especially dangerous infections. 2016, no 2. pp. 28-35.	doi: 10.21055/0370-1069-2016-2-28-35
4	Справочник по лабораторным методам исследования. Под ред. Л. А. Даниловой. Москва: Питер; 2003. 733 с.	Handbook of laboratory research methods. Pod red. L. A. Danilovoj. -	

		<i>Moskva : Piter, 2003, 733 p. (In Russ.)</i>	
5	Bianchi VE. Weight loss is a critical factor to reduce inflammation. Clin Nutr ESPEN. 2018, vol. 28, pp. 21-35.		doi: 10.1016/j.clnesp.2018.08.007.
6	Chan AS, Rout A. Use of Neutrophil-to-Lymphocyte and Platelet-to-Lymphocyte Ratios in COVID-19. J Clin Med Res. 2020, vol. 12, no7, pp. 448-453.		doi:10.14740/jocmr4240
7	Dubé JY, McIntosh F, Zarruk JG, David S, Nigou J, Behr MA. Synthetic mycobacterial molecular patterns partially complete Freund's adjuvant. Sci Rep. 2020, vol.10, no. 1, 5874 p.		doi:10.1038/s41598-020-62543-5
8	Fontes JA, Barin JG, Talor MV, Stickel N, Schaub J, Rose NR, Čiháková D. Complete Freund's adjuvant induces experimental autoimmune myocarditis by enhancing IL-6 production during initiation of the immune response. Immun Inflamm Dis. 2017, vol. 5, no 2, pp. 163-176.		doi: 10.1002/iid3.155
9	Ghasemi A, Jeddi S, Kashfi K. The laboratory rat: Age and body weight matter. EXCLI J. 2021, no. 20. pp. 1431-1445.		doi:10.17179/excli2021-4072
10	https://www.statskingdom.com/170median_mann_whitney.html		
11	Ito F, Sono Y, Ito T. Measurement and Clinical Significance of Lipid Peroxidation as a Biomarker of Oxidative Stress: Oxidative Stress in Diabetes, Atherosclerosis, and Chronic Inflammation. Antioxidants (Basel). 2019, vol. 8, no. 3, 72 p.		doi:10.3390/antiox8030072.

12	Le Moignic and Pinoy (1916) Les vaccins en emulsion dans les corps gras ou "lipo-vaccins." Comptes Rendus de la Societe de Biologie, no 79, pp. 201-203		
13	Lin YJ., Wen CN., Lin YY., Hsieh WC., Chang CC., Chen YH., Hsu CH., Shih YJ., Chen CH., Fang CT. Oil-in-water emulsion adjuvants for pediatric influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis. Nat Commun. 2020, vol. 11, no. 1, 315 p.		doi:10.1038/s41467-019-14230-x
14	Noh ASM, Chuan TD, Khir NAM, Zin AAM, Ghazali AK, Long I, Ab Aziz CB, Ismail CAN. Effects of different doses of complete Freund's adjuvant on nociceptive behaviour and inflammatory parameters in polyarthritic rat model mimicking rheumatoid arthritis. PLoS One. 2021, vol. 16, no. 12, pp. e0260423.		doi:10.1371/journal.pone.0260423.
15	Nuwarda RF, Alharbi AA, Kayser V. An Overview of Influenza Viruses and Vaccines. Vaccines (Basel). 2021, vol. 9, no 9, 1032 p.		doi:10.3390/vaccines9091032
16	Powell BS, Andrianov AK, Fusco PC. Polyionic vaccine adjuvants: another look at aluminum salts and polyelectrolytes. ClinExpVaccineRes. 2015, vol. 4, no. 1, pp. 23–45.		doi: 10.7774/cevr.2015.4.1.23.
17	Rodrigues CMC, Plotkin SA. Impact of Vaccines; Health, Economic and Social Perspectives. Front Microbiol. 2020, vol. 11, 1526 p.		doi:10.3389/fmicb.2020.01526

18	Siegel A, M. Walton R. Hematology and Biochemistry of Small Mammals. Ferrets, Rabbits, and Rodents. 2020, pp. 569-582.		doi:10.1016/B978-0-323-48435-0.00039-3
19	Tizard IR. Adjuvants and adjuvanticity. Vaccines for Veterinarians. 2021, pp. 75-86.		doi:10.1016/B978-0-323-68299-2.00016-2.
20	Vaccines: Expert Consult (Vaccines (Plotkin)) 5th Edition. by Stanley A. Plotkin, Walter Orenstein, Paul A. Offit. 1748 p.		
21	Washington IM., Van Hoosier G. Clinical Biochemistry and Hematology. The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents. 2012, pp. 57-116.		doi:10.1016/B978-0-12-380920-9.00003-1
22	Zhang W, Lyu J, Xu J, Zhang P, Zhang S, Chen Y, Wang Y, Chen G. The related mechanism of complete Freund's adjuvant-induced chronic inflammation pain based on metabolomics analysis. Biomed Chromatogr. 2021, vol. 35, no. 4, e5020		doi: 10.1002/bmc.5020.