

**На правах рукописи**

**Фирстова Виктория Валерьевна**

**Экспериментально-иммунологическое обоснование выбора стратегии  
оценки поствакцинального иммунитета против чумы и туляремии**

**14.03.09 - Клиническая иммунология, аллергология**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертация на соискание ученой степени**

**доктора биологических наук**

**Оболенск - 2015**

Работа выполнена в ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный консультант: доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН Караулов А.В.

**Официальные оппоненты:**

Пронин Александр Васильевич, доктор биологических наук, профессор, ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, зам. директора по научной работе.

Рубальский Олег Васильевич, доктор медицинских наук, профессор, ГБОУ ВПО «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, проректор по научной и инновационной работе.

Апарин Петр Геннадьевич, доктор медицинских наук, ФГБУ "Государственный научный центр "Институт иммунологии" Федерального медико-биологического агентства, заведующий лабораторией.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» Российской академии медицинских наук.

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 г. на заседании диссертационного совета Д 208.046.02 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора по адресу: 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10 и на сайте <http://www.gabrich.com>.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
кандидат медицинских наук

Л.И. Новикова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность темы исследования и степень ее разработанности**

Крупные вспышки и спорадические случаи туляремии и чумы, относящиеся к особо опасным возвращающимся инфекционным заболеваниям, периодически регистрируются во многих странах мира, в том числе, и в России [Балахонов С.В., 2013; Мокриевич А.Н., 2013; Попов Н.В., 2014]. Сохранение эпизоотически активных природных очагов, вероятность применения *Francisella tularensis* и *Yersinia pestis* при биотеррористических актах, сложность постановки клинического диагноза обуславливают необходимость разработки новых средств вакцинопрофилактики. В тоже время серьёзным препятствием в создании новых вакцин является отсутствие объективных критериев для оценки эффективности и продолжительности иммунитета.

Разработка методов оценки поствакцинального клеточного противочумного и противотуляремийного иммунитета является актуальным направлением, решение которого особенно необходимо для осуществления индивидуального подхода к ревакцинации; выбора антигенов, активирующих клеточное звено иммунитета, при конструировании вакцин; для заключения о наличии напряженного иммунитета, особенно против аэрозольного заражения инфекциями.

В нашей стране и странах СНГ для профилактики чумы и туляремии используются живые вакцины. Живая чумная вакцина и туляремийная вакцина обеспечивают защиту на один год и пять лет, соответственно, и требуют периодической ревакцинации. В случае ревакцинации живой вакциной человека, имеющего специфический иммунитет к инфекции, вакцинопрофилактика будет не эффективной. Это связано с активацией клеток памяти и синтезом антител и активацией клеточных реакций, которые приведут к элиминации бактерий вакцинного штамма до формирования иммунитета.

О наличии противочумного или противотуляремийного иммунитета судят по наличию антител в крови к F1 антигену *Y. pestis* и липополисахариду

*F. tularensis*, соответственно. В то же время при формировании противочумного и противотуляремийного иммунитета большая роль отводится обоим звеньям иммунной системы: гуморальному и клеточному. После вакцинации и заболевания туляремией или чумой появляются специфические антитела, которые играют определенную роль в защите от повторного заражения, но, тем не менее, не всегда коррелируют с защитой организма от инфекции [Ehrenkranz N.J., 1955; Burke D.S., 1977; Tärnvik A., 1989; Parent M.A., 2005]. Поэтому для оценки напряженности противочумного/противотуляремийного иммунитета необходимо выявлять как специфические антитела, так и оценивать специфические клеточные реакции.

Поиску методов, позволяющих выявить наличие клеточного противочумного и противотуляремийного иммунитета, посвящено множество работ [Витязева С.М., 2013; Аронова Н.В., 2014; Karttunen R., 1985; Kim E.J., 2008; Salerno-Gonçalves R., 2009]. В 70-е годы оценку напряженности Т-клеточного иммунитета против туляремии и чумы проводили, используя кожную или внутрикожную аллергическую пробу с тулярином или пестином, соответственно. Однако широкого распространения эти методы не нашли в связи с побочными реакциями, проявляющимися в ухудшении состояния вакцинированного/больного (как проявление общей реакции организма), а в некоторых случаях развитием некроза (как проявление местной реакции). В дальнейшем для выявления специфического клеточного иммунитета предлагались реакции *in vitro*: реакция лейкоцитолита с тулярином для оценки клеточного противотуляремийного иммунитета и показатель повреждения нейтрофилов в тесте с пестином – для оценки клеточного противочумного иммунитета. С появлением современных методов исследований наличие клеточного противотуляремийного и противочумного иммунитета пытались оценивать на основании подсчета эффекторных клеток памяти  $CD45RA^{-/+}$ ,  $CD62^{-}$  [Salerno-Goncalves R., 2009], по усилению пролиферативной активности лимфоцитов [Витязева С.М., 2013], усилению синтеза клетками ИФН- $\gamma$  [Waag D.M., 1995; El Sahly H. M., 2009], ИЛ-2 и ФНО- $\gamma$  [Eneslätt K., 2012] в ответ на рестимуляцию

клеток *in vitro* антигенами туляремийного или чумного микроба. Тем не менее, вопрос о методах оценки клеточного противотуляремийного и противочумного иммунитета остается открытым.

**Цель исследования** – разработать алгоритм оценки напряженности поствакцинального иммунитета к чуме и туляремии в реакциях *in vitro*.

**Задачи исследования:**

1. Проанализировать наличие корреляции между изменением экспрессии маркеров лимфоцитов, их пролиферативной активностью, цитокиновой активностью в реакциях *in vitro* под влиянием тулярина, кислото-нерастворимого комплекса, рекомбинантного белка 1696, ультразвукового дезинтеграта *F. tularensis* и напряженностью иммунитета к туляремии у мышей.

2. Выявить различия в ключевых показателях специфической активации лимфоцитов под влиянием тулярина и кислото-нерастворимого комплекса *F. tularensis*, коррелирующие с защитой мышей от заражения бактериями туляремии различной вирулентности.

3. Оценить длительность протективного иммунитета к туляремии и длительность проявления специфических клеточных реакций в ответ на реактивацию лимфоцитов антигенами *F. tularensis* у мышей, иммунизированных живой туляремийной вакциной.

4. Изучить влияние степени воспаления, индуцированного разными дозами *F. tularensis* 15 НИИЭГ на формирование клеточного и гуморального противотуляремийного иммунитета.

5. Предложить методы оценки иммунитета к туляремии у людей.

6. Изучить изменение функциональной активности лимфоцитов под влиянием F1, V, Pla антигенов и ультразвукового дезинтеграта *Y. pestis* в реакциях *in vitro* и выявить маркеры, отражающие наличие клеточного противочумного иммунитета.

7. Выявить различия в механизмах активации В и Т лимфоцитов под влиянием антигенов *F. tularensis* и *Y. pestis* в клеточных реакциях *in vitro* у вакцинированных и невакцинированных против туляремии и чумы.

8. Предложить методы оценки иммунитета к чуме у людей.
9. Оценить иммунный статус у постоянно вакцинирующихся против чумы, туляремии, сибирской язвы людей.
10. Изучить возможность использования предложенных методов для комплексной оценки специфического иммунитета при других инфекциях.

### **Научная новизна**

Впервые показано, что защита мышей против заражения *F. tularensis* 503 (subsp. *holarctica*) коррелирует с усилением экспрессии CD69 рецептора на поверхности Т хелперов, синтезом ИФН- $\gamma$  и ИЛ-17 спленоцитами в ответ на активацию клеток кислото-нерастворимым комплексом. О наличии протективного иммунитета при заражении штаммом Schu *F. tularensis* subsp. *tularensis* – наиболее вирулентным штаммом туляремийного микроба – косвенно свидетельствуют не только уровень антител к липополисахариду и кислото-нерастворимому комплексу *F. tularensis*, способность лимфоцитов синтезировать ИФН- $\gamma$ , ИЛ-17 и активировать Т хелперы под влиянием кислото-нерастворимого комплекса, но также и способность цитотоксических лимфоцитов активироваться под влиянием кислото-нерастворимого комплекса.

Впервые показано, что у вакцинированных против туляремии доноров под влиянием антигенов *F. tularensis* отмечается специфическое усиление экспрессии маркера ранней активации CD69 на поверхности Т хелперов и цитотоксических лимфоцитов, и маркера поздней активации HLA-DR на поверхности Т-клеток памяти (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>).

Выявлены разные пути активации Т лимфоцитов под влиянием тулярина или кислото-нерастворимого комплекса у невакцинированных и вакцинированных против туляремии доноров. Под влиянием тулярина или кислото-нерастворимого комплекса лимфоциты вакцинированных доноров активировались через CD28 и CD154 рецепторные молекулы. Лимфоциты неиммунных доноров активировались без участия CD154, что свидетельствовало об отсутствии активации Th1 иммунного ответа.

Впервые показано, что в отличие от невакцинированных доноров у иммунизированных живой чумной вакциной людей, под влиянием F1 антигена на поверхности В лимфоцитов происходило усиление экспрессии CD86, что отражает активацию не только гуморального, но и клеточного звена иммунитета.

Выявлены разные механизмы межклеточной активации Т и В лимфоцитов, полученных от интактных и иммунных мышей под влиянием F1 антигена. Активация клеток у иммунных животных происходила по CD28-независимому пути за счет взаимодействия рецепторов В лимфоцитов CD40L с индуцибельной мембранной молекулой CD154, способствующей развитию иммунного ответа по Th1 пути.

Впервые показано, что маркер поздней активации HLA-DR, под влиянием F1 антигена *Y. pestis* специфически появляется и на поверхности CD45RO<sup>+</sup> Т хелперов и на поверхности CD45RO<sup>+</sup> цитотоксических лимфоцитов, полученных от иммунизированных живой чумной вакциной доноров.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Результаты настоящего исследования вносят существенный вклад в изучение особенностей механизмов активации Т и В лимфоцитов иммунного и неиммунного организма под влиянием специфических антигенов *Y. pestis* и *F. tularensis*. Научно обосновано и подтверждено в экспериментах на животных, что способность лимфоцитов изменять экспрессию поверхностных маркеров и активность синтеза цитокинов под влиянием антигенов *Y. pestis* и *F. tularensis in vitro* отражает наличие специфического клеточного иммунитета, достаточного для защиты от заражения туляремией и чумой. Расширены представления об иммунологических механизмах обеспечения протективного иммунитета против бактерий *F. tularensis* разной вирулентности.

В результате проведенной работы предложен комплекс иммунологических показателей, отражающих наличие клеточного противотуляремийного и противочумного иммунитета, что важно для оценки иммунобиологических свойств антигенов и штаммов – кандидатов в вакцинные, а также для выявления специфического иммунитета у людей после вакцинации.

Результаты проведенных исследований послужили основой при составлении ниже перечисленных документов:

- МУ 3.3.1.2161-07. Методические указания. «Основные требования к вакцинным штаммам туляремиального микроба» (утверждены и введены в действие Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г.Г. Онищенко 12.02.2007 г.);

- МР 1.2.0052-11. «Оценка воздействия наноматериалов на функцию иммунитета» (утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г.Г.Онищенко 29.12.2011 г.);

- «Методические рекомендации. Оценка напряженности специфического клеточного иммунитета у людей к возбудителю туляремии *in vitro*» (одобрены Ученым советом ФБУН ГНЦ ПМБ и утверждены директором ФБУН ГНЦ ПМБ, протокол Ученого совета ФБУН ГНЦ ПМБ № 8 от 07.10.2011 г.).

Разработанные документы используются в ФБУН ГНЦ ПМБ, ФКУЗ РНИПЧИ «Микроб» для отбора и предварительной оценки иммунобиологических свойств потенциальных вакцинных штаммов *F. tularensis*, изучения свойств потенциальных кандидатов в вакцинные штаммы против туляремии и чумы, повышения эффективности оценки противочумного и противотуляремиального поствакцинального иммунитета у людей.

Данные экспериментальных исследований диссертационной работы используются при чтении лекций на курсах по магистерской образовательной программе «Нанобиобезопасность» Пущинского государственного естественнонаучного института (ПущГЕНИ) и по программе курсов повышения квалификации «Микробиология. Основы и особенности работы с биологическими агентами I-IV групп патогенности в научно-исследовательских лабораториях».



## **Методология и методы исследования**

Методология исследования спланирована с учетом современных принципов научного познания и организована адекватно поставленной цели. Объектами исследования являлись экспериментальные животные и доноры, периодически вакцинируемые против чумы, туляремии и сибирской язвы. Предметом исследования являлось изучение особенностей формирования специфических клеточных реакций против возбудителей особо опасных инфекций.

Планирование и проведение исследований, направленных на решение поставленных задач, осуществлялось на основе общенаучных и специфических методов: биологических, микробиологических, микроскопических, иммунологических, цитометрических, оценки физиологического состояния животных, методов статистической обработки результатов.

*Биологические методы исследования* включали проведение экспериментальных исследований на мышах, термометрирование и определение веса животных, оценку внешнего вида и общего состояния.

*Микробиологические методы исследований* применяли для выявления обсемененности бактериями органов животных, а также в целях получения бактериальных культур *Y. pestis*, *F. tularensis*, *B. anthracis* для иммунизации животных.

Для оценки жизнеспособности иммунокомпетентных клеток, морфологии бактерий, подсчета клеток применяли *микроскопические методы исследований*.

*Цитометрические методы исследований* использовали для иммунофенотипирования лимфоцитов, оценки изменения пролиферативной активности лимфоцитов под влиянием специфических антигенов и митогенов, определения активности синтеза внутриклеточных цитокинов субпопуляциями лимфоцитов, проведения СВА-анализа, позволяющего в небольшом объеме сыворотки или супернатанта выявлять концентрации 10-12 цитокинов одновременно.

*Иммунологические методы исследований* включали в себя получение спленоцитов, лимфоцитов, культивирование иммунокомпетентных клеток,

определение титра антител к возбудителям туляремии и чумы методом твердофазного иммуоферментного анализа, постановку реакции лейкоцитолита, реакцию басттрансформации лимфоцитов.

При выполнении работы использовались *информационные средства*: отечественные и международные научные компьютерные базы данных и информационные ресурсы PubMed, Medline, Wiley Online Library, e-library, материалы российских и зарубежных научных журналов, российских и международных конференций.

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Усиление экспрессии CD69 рецептора на поверхности Т лимфоцитов, синтеза ИФН- $\gamma$  и ИЛ-17 спленоцитами в ответ на реактивацию кислото-нерастворимым комплексом, а также наличие антител к липополисахариду и кислото-нерастворимому комплексу *F. tularensis* коррелируют с наличием протективного противотуляремийного иммунитета у мышей.

2. По изменению количества клеток, экспрессирующих CD69 рецептор на поверхности Т хелперов и HLA-DR маркер на поверхности CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> клеток, под влиянием тулярина можно судить о наличии противотуляремийного клеточного иммунитета у людей.

3. Активация Т лимфоцитов под влиянием тулярина или кислото-нерастворимого комплекса у вакцинированных против туляремии доноров инициируется через CD28 и CD154 рецепторную молекулы. Лимфоциты неиммунных доноров активируются без участия CD154, что свидетельствует о ингибировании Th1 иммунного ответа.

4. В крови, полученной от доноров, иммунизированных живой чумной вакциной, под влиянием F1 антигена на поверхности В лимфоцитов происходит усиление экспрессии CD86, что способствует активации Т лимфоцитов.

5. По увеличению экспрессии маркера поздней активации HLA-DR, под влиянием F1 антигена *Y. pestis* на поверхности CD45RO<sup>+</sup> лимфоцитов можно судить о наличии противочумного клеточного иммунитета у людей.

## **Степень достоверности и апробация результатов исследования**

О достоверности результатов работы свидетельствует использование современных автоматизированных методов исследования, поддерживающихся программными обеспечениями для анализа и статистической обработки результатов. Использование адекватных методов исследования позволило количественно оценить способность Т и В лимфоцитов к специфической активации под влиянием антигенов, а также выявить маркеры отражающие наличие клеточного противочумного и противотуляремийного иммунитета.

Диссертация апробирована на заседании Ученого совета ФБУН ГНЦ ПМБ (протокол № 42 от 24 декабря 2014).

Материалы диссертации доложены и обсуждены на ряде научных форумов: Всероссийской научно-практической конференции «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2009); Научно-практической конференции молодых ученых и специалистов научно-исследовательских учреждений Роспотребнадзора «Биологическая безопасность в современном мире» (Оболensk, 2009); XVII Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2010); Международной конференции «Развитие научных исследований и надзор за инфекционными заболеваниями» (Санкт-Петербург, 2010); 10-м интернациональном симпозиуме «*Yersinia* 2010» (Бразилия, Ресиф, 2010); 6-ой международной конференции по зоонозам (Мексика, Канкун, 2011); 1-ой Международной конференции по инфекционным заболеваниям и наномедицине (Непал, Катманду, 2012); Международном симпозиуме по опасным заболеваниям (Австрия, Вена, 2014).

Предложенный метод оценки клеточного противотуляремийного иммунитета используется для оценки поствакцинального иммунитета у сотрудников ФБУН ГНЦ ПМБ, а также в учебном процессе Пущинского государственного естественнонаучного института (ПущГЕНИ) и курсах повышения квалификации при ГНЦ ПМБ. Подготовлены методические рекомендации и методические указания.

## **Публикации**

Основное содержание работы отражено в 35 научных публикациях, в том числе в 13 статьях в журналах из списка изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для публикации основных результатов диссертаций на соискание ученой степени доктора биологических наук, одном руководстве и одной монографии.

## **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 281 странице, содержит 24 таблицы, 48 рисунков. Диссертация включает главы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты исследований», «Обсуждение», «Выводы», «Список литературы». Библиография включает в себя 422 источника, в том числе 46 отечественных и 376 зарубежных.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖЕНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы**

Штаммы *F. tularensis* 15 НИИЭГ, *F. tularensis* 15 Δ 23 rec A, *F. tularensis* Schu, *Y. pestis* EV линии 15 НИИЭГ, *Y. pestis* 231, *B. anthracis* СТИ-1 получены из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов (ФГУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия).

В работе использовали антигены бактерий *Y. Pestis* (F1 – капсульный антиген; Pla – плазминоген активатор; V – антиген; УЗД – ультразвуковой дезинтеграт); *F. tularensis* (КНК – кислото-нерастворимый комплекс, *F. tularensis* – белково-липополисахаридная фракция; УЗД) и *B. anthracis* (РА – протективный антиген и LF – летальный фактор). Препараты КНК предоставлены доктором биологических наук В.М. Павловым (отдел ГНЦ ПМБ). Все препараты антигенов чумного микроба получены из лаборатории микробиологии чумы ГНЦ ПМБ. В работе использовался коммерческий препарат тулярин – аллерген

туляремийный жидкий для накожного применения, содержащий бактерии *F. tularensis* 15, инактивированные нагреванием (ГУП НПО «Микроген»).

Экспериментальная часть выполнена с использованием в качестве биомоделей 2000 инбредных мышей линии BALb/c весом 18-20 г, полученных из отдела экспериментальных животных вивария ГНЦ ПМБ.

В ходе выполнения работы было обследовано 85 вакцинированных волонтеров и 20 не привитых доноров (группа сравнения). Вакцинацию коммерческими живой чумной вакциной (ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора) и живой туляремийной вакциной (ГУП НПО «Микроген») проводили накожным способом в плановом порядке и согласно приказу Минздрава России от 27.07.2001 № 229 «О национальном календаре профилактических прививок по эпидемическим показаниям» и в полном соответствии с утвержденными инструкциями по применению вакцин. Клинические лабораторные исследования проводились согласно лицензии № ФС-99-01-006505 от 17.09.2009, выданной Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения и социального развития на осуществление медицинской деятельности ФБУН ГНЦ ПМБ.

Мышей иммунизировали живой туляремийной вакциной однократно, подкожно или внутрикожно в дозах 5, 15, 45 и 135 КОЕ/мышь. На 28 сутки после иммунизации у половины иммунизированных мышей отбирали сыворотку крови и спленоциты на исследования.

Мышей иммунизировали живой туляремийной вакциной однократно, подкожно или внутрикожно в дозе 100 КОЕ/мышь. На 30, 60, 90, 120, 150 и 180 дни после иммунизации у половины иммунизированных мышей отбирали сыворотку крови и спленоциты на исследования.

Мышей иммунизировали подкожно (п.к.) однократно *F. tularensis* 15 Δ 23 rec A ( $1 \times 10^3$  CFU); двукратно: *F. tularensis* 15 Δ 23 rec A ( $1 \times 10^3$  КОЕ), а через четыре недели *F. tularensis* 15 Δ 23 rec A ( $1 \times 10^4$  КОЕ) или *F. tularensis* 15 НИИЭГ ( $1 \times 10^4$  КОЕ). На 28 сутки после последней иммунизации

половину мышей из каждой группы использовали для проведения иммунологических исследований.

По 10 экспериментальных животных из каждой группы заражали вирулентным штаммом *F. tularensis* 503 в дозе  $1 \times 10^3$  КОЕ/мышь подкожно или интраназально *F. tularensis* Schu 100 DCL. Наблюдение за зараженными животными проводили в течение 21 суток, погибших животных вскрывали и подвергали бактериологическому исследованию. Все зараженные туляремией интактные мыши погибали на четвертый-шестой дни после заражения.

Мышей иммунизировали подкожно живой чумной вакциной однократно или двукратно препаратами на основе F1 и/или V антигена (по 10 мкг каждого антигена на мышь), содержащими гидроксид алюминия. На 28 сутки после иммунизации у части иммунизированных мышей отбирали сыворотку крови и селезенки на исследования. Вторую половину экспериментальных животных заражали вирулентным штаммом *Y. pestis* 231 в дозе 200 Dcl/мышь подкожно. Оценку вирулентности проводили на мышах в условиях лаборатории уровня биологической безопасности BSL3. Наблюдение за зараженными животными проводили в течение 21 суток, погибших животных вскрывали и подвергали бактериологическому исследованию. Все зараженные чумой интактные мыши погибали на четвертый-шестой дни после заражения.

Мышей иммунизировали однократно подкожно протективной дозой ( $10^7$  спор) коммерческой вакцины *B. anthracis* СТИ-1 согласно п. 12.7.8 регламента производства вакцины сибиреязвенной живой № 831-98 (от 25 декабря 1998 г.). На 21 сутки иммуногенеза полноценность сформированного у животных приобретенного иммунитета подтверждали в опытах по заражению вакцинированных и интактных мышей вирулентным штаммом – *B. anthracis* 2-я вакцина Ценковского.

Вычисление величин LD<sub>50</sub> проводили по методу Кэрбера в модификации. Напряженность иммунитета (индекс иммунитета (ИИ)), т.е. способность вакцинного препарата предохранять животное от заражения массивными дозами вирулентной культуры, определяли по величине заражающей дозы, выраженной в

LD<sub>50</sub> вирулентного штамма для интактных животных, при заражении которой на 21 сутки выживает не менее 50 % животных, определяли по формуле

$$\text{ИИ} = \frac{LD50_{\text{имм}}}{LD50_{\text{инт}}}, \quad (1)$$

где ИИ – индекс иммунитета;  $LD50_{\text{имм}}$  – LD<sub>50</sub> для животных, иммунизированных исследуемым препаратом;  $LD50_{\text{инт}}$  – LD<sub>50</sub> для интактных животных, КОЕ.

Спленоциты получали общепринятыми методами [Mosmann T.R., 1986]. Лимфоциты крови получали на градиенте плотности (1,077 г/л) фикоколверографина (Sigma, США). В качестве стимуляторов использовали антигены *F. tularensis*, *Y. pestis*, *B. subtilis*, ЛПС *E. coli* (Sigma, США), Con A (Sigma, США), GolgiPlug (BD Bioscience, США), тулярин (ГУП НПО «Микроген»). Лимфоцитарную массу ( $2 \times 10^6$  клеток/мл) инкубировали в лунках 96-луночного планшета по 200 мкл при температуре 37 °С, во влажной атмосфере, 5 % углекислого газа (CO<sub>2</sub>) в присутствии 10 мкг/мл антигенов (КНК, УЗД *F. tularensis*, V, F1, Pla, УЗД *Y. pestis*, PA, LF *B. anthracis*), тулярина ( $10^8$  КОЕ/мл) или в среде в течение 24 ч – для выявления субпопуляций активированных лимфоцитов по поверхностным маркерам; 48 ч – для анализа внутриклеточных цитокинов; 72 ч – для анализа уровня цитокинов в надосадочной жидкости; шести суток – для определения пролиферативной активности лимфоцитов.

Иммунокомпетентные клетки окрашивали моноклональными антителами к маркерам мыши или человека: CD3, CD28, CD95, CD86, CD80, CD25 (BD Biosciences Pharmingen), CD4 APC, CD8 PE, CD69, CD19, CD22, ИФН- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ , ИЛ-17, ИЛ-4 (Caltag, Invitrogen), мечеными флюорохромами FITC, PE, PerCP, PerCP-Cy5.5 или APC, в соответствии с инструкцией производителя. Анализ проводили на проточном цитофлюориметре FACSCalibur, BD (США) с использованием программы «Cell QuestPro».

Пролиферативную активность лимфоцитов оценивали методом бласттрансформации лимфоцитов [Mishell B.V., 1980] и с использованием

красителя CFSE в соответствии с инструкцией производителя (BD e-Bioscience, США).

Между группами неиммунных и иммунизированных животных или группами доноров сравнивали изменения количества анализируемых субпопуляций клеток под влиянием антигенов.

Определение концентраций цитокинов ИЛ-1, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-17, ИФН- $\gamma$  и ФНО- $\alpha$  проводили в супернатанте культур клеток с использованием набора для выявления Th1/Th2 цитокинов и тест-систем для ИФА (Bender MedSystems, Германия). Постановку реакции лейкоцитолита проводили в соответствии с МУ 3.1.2007-05. Титры антител выявляли в твердофазном иммуноферментном анализе. Сыворотки тестировали на планшетах, сенсibilизированных в лабораторных условиях отдельно антигенами V, F1, КНК, ЛПС, РА, LF или тулярином. Результаты ИФА оценивали на микропланшетном спектрофотометре «Униплан» («Пикон», Россия) при длине волны 490 нм.

Обработку полученных данных проводили методами вариационной статистики при помощи программы Microsoft Excel 2007.

#### **Оценка противотуляремийного иммунитета у мышей линии BALB/c после иммунизации препаратами против туляремии**

У мышей, иммунизированных живой туляремийной вакциной, оценивали гуморальный и клеточный иммунитет к возбудителю туляремии. У всех животных в сыворотке крови обнаруживали антитела против КНК и ЛПС *F. tularensis* в титрах от 1:200 до 1:1600. Гуморальный иммунитет к туляремии играет большую роль в защите организма от туляремийной инфекции, но только на фоне развития клеточных реакций Th1 типа [Cowley S.C., 2011]. В подтверждение этому свидетельствует, например, что иммунная сыворотка или очищенные противотуляремийные антитела не защищают мышей от вирулентного штамма *F. tularensis* типа А [Thorpe B.D., 1967]. Кроме того, попытки создать вакцину на основе ЛПС *F. tularensis* или его конъюгатов с белками также не увенчались успехом и позволили получить лишь слабую защиту от вирулентного штамма *F. tularensis* типа Б [Kieffer T.L., 2003; Cole L.E., 2009].



Для оценки противотуляремийного клеточного иммунитета мы изучали изменения пролиферативной активности В и Т лимфоцитов, синтеза цитокинов и экспрессии поверхностных маркеров лимфоцитов под влиянием антигенов *F. tularensis*. Наши экспериментальные исследования показали, что из всех используемых антигенов специфические изменения клеточных реакций происходили под влиянием КНК или тулярина, которые мы и использовали в дальнейших исследованиях.

Активация Т лимфоцитов осуществляется за счет взаимодействия паттернраспознающих рецепторов с антигенами бактерий и при сочетанном взаимодействии рецепторов на поверхности Т лимфоцита с рядом комплементарных молекул на поверхности антигенпредставляющей клетки [Laugel В., 2011; Le-Carlson М., 2013]. Мы провели сравнительный анализ изменений экспрессии TLR-2, CD28, CD154, CD69 на поверхности лимфоцитов под влиянием антигенов *F. tularensis* между группами иммунных и интактных мышей. Сравнительный анализ изменения экспрессии TLR-2, CD28 и CD154 рецепторов на поверхности Т-клеток под влиянием антигенов *F. tularensis* не выявил достоверных различий между группами мышей.

Под влиянием тулярина и КНК происходило специфическое усиление экспрессии CD69 рецептора на поверхности Т хелперов, полученных от мышей иммунизированных *F. tularensis* 15 НИИЭГ ((6,94±1,14) %, и (9,87±1,22) %, соответственно) по сравнению количеством CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> интактных животных ((2,3±1,1) % и (1,5±0,35) %, соответственно). В присутствии тулярина и КНК происходило специфическое усиление синтеза ИНФ-γ и ИЛ-17 лимфоцитами, полученными от мышей иммунизированных *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

Мы проанализировали длительность проявления клеточных и гуморальных реакций у мышей после иммунизации *F. tularensis* 15. На протяжении полугода у всех мышей, иммунизированных *F. tularensis* 15, выявлялся высокий не снижающийся уровень антител к КНК (рисунок 1) и ЛПС.

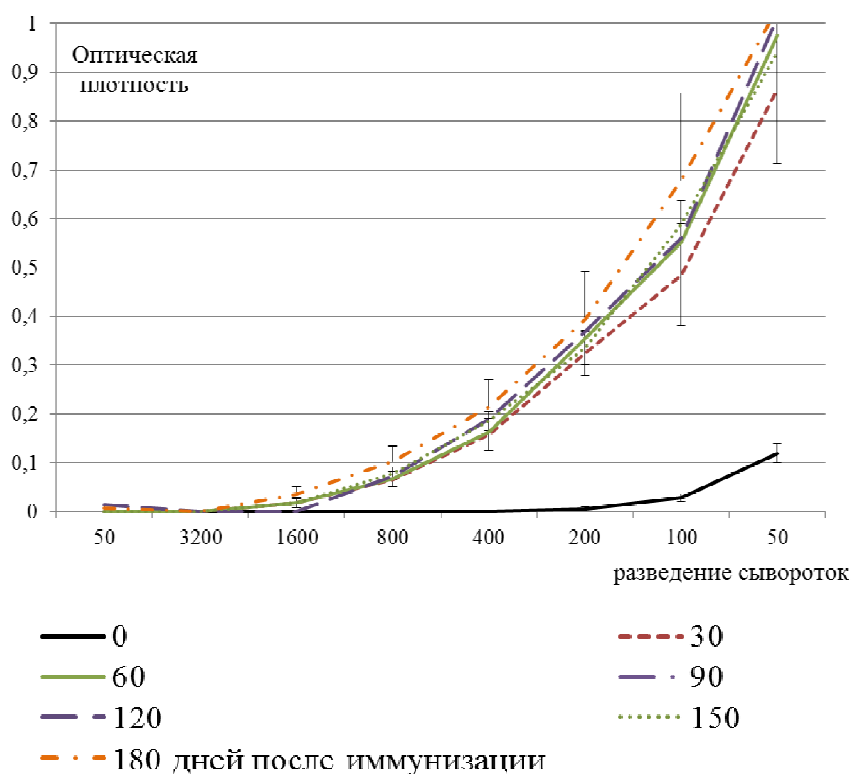


Рисунок 1 – Уровень антител к КНК в сыворотке крови у мышей в разные сроки после иммунизации *F. tularensis* 15 НИИЭГ

Анализ клеточных реакций показал, что КНК индуцировал выраженное усиление экспрессии CD69 маркера на поверхности CD19<sup>+</sup> В лимфоцитов, выделенных от иммунных мышей, как в ранние, так и в отдаленные сроки исследований после иммунизации животных *F. tularensis* 15 (таблица 1).

КНК также способствовал активации В лимфоцитов интактных мышей, но усиление экспрессии CD69 рецептора на их поверхности было менее выраженным по сравнению с В лимфоцитами, полученными от иммунных животных. У мышей, иммунизированных *F. tularensis* 15, на поверхности Т хелперов во все сроки исследований наблюдали специфическое усиление экспрессии CD69 рецептора в присутствии КНК усиливающееся к 120 дню после иммунизации. На поверхности цитотоксических лимфоцитов CD69 рецептор усиливал экспрессию под влиянием КНК в культурах клеток мышей, иммунизированных не более 3 месяцев назад.

Таблица 1 – Изменение процентного содержания активированных (CD69<sup>+</sup>) лимфоцитов в реакции *in vitro* с КНК\*

Субпопуляция лимфоцитов	Условия инкубирования	Сроки экспериментов после иммунизации мышей <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ, дни						
		0	30	60	90	120	150	180
CD19 <sup>+</sup>	Среда	0,35±0,12	4,3±1,21	2,9±1,05	3,7±1,41	4,8±2,14	4,5±1,45	6,05±2,58
CD69 <sup>+</sup>	Среда + КНК	10,02±3,56	<b>38,7±6,58</b>	<b>21,4±4,87</b>	<b>23,6±4,98</b>	<b>33,1±5,47</b>	<b>32,4±6,15</b>	<b>24,2±2,58</b>
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	Среда	1,05±0,14	1,8±0,58	1,4±0,24	2,7±0,98	3,03±1,02	2,3±0,58	3,2±1,25
CD69 <sup>+</sup>	Среда + КНК	2,65±0,34	<b>5,7±0,28</b>	3,9±0,54	<b>7,6±2,58</b>	<b>12,2±1,89</b>	<b>9,4±2,15</b>	<b>12,2±2,14</b>
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	Среда	1,25±0,63	1,6±0,40	2,1±1,78	2,8±1,87	0,7±0,11	0,6±0,34	1,4±0,88
CD69 <sup>+</sup>	Среда + КНК	4,20±2,68	<b>14,4±5,16</b>	<b>7,9±1,01</b>	<b>14,8±8,25</b>	3,6±0,49	4,6±0,4	3,06±1,64

Примечание:

\*n = 10.

Значения, выделенные жирным шрифтом, достоверно отличаются (p < 0,05) от данных контрольных клеток (столбец «0»), стимулированных КНК. Контрольные клетки (столбец «0») - лимфоциты, выделенные у интактных мышей.

Во все сроки исследований после иммунизации мышей *F. tularensis* 15 отмечали специфическое усиление синтеза ИЛ-17, ИЛ-10 и ИФН- $\gamma$  лимфоцитами в ответ на стимуляцию клеток КНК (рисунок 2). Максимальный синтез цитокинов рестимулированными клетками отмечался на 30 сутки после иммунизации мышей против туляремии.

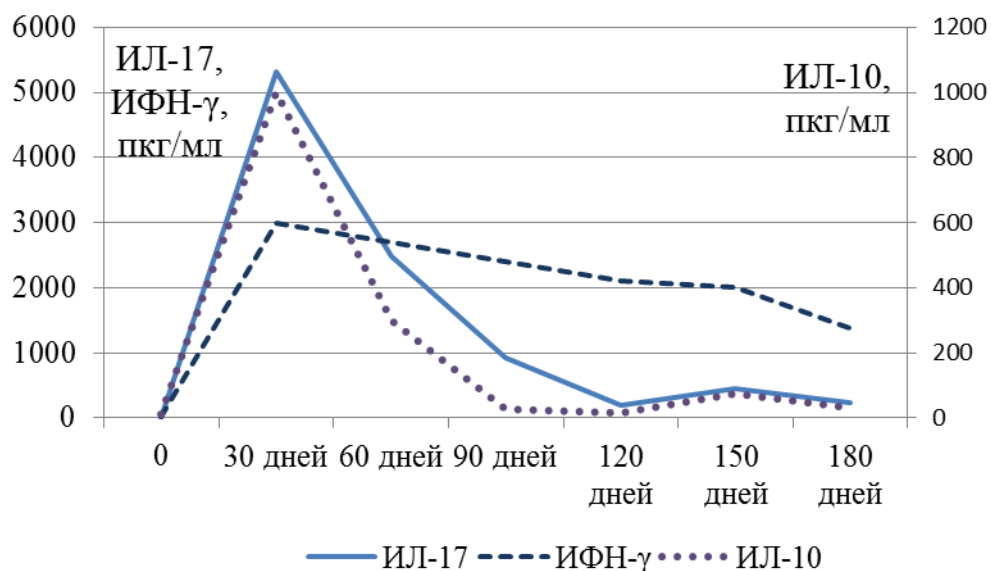


Рисунок 2 – Влияние КНК на изменение синтеза цитокинов спленоцитами, полученными от мышей в разные сроки после иммунизации животных *F.tularensis* 15

Уровень пролиферативной активности лимфоцитов, полученных от мышей, иммунизированных *F. tularensis* 15, в ответ на активацию клеток КНК был максимально высоким на 30 сутки после иммунизации.

Во все сроки исследований (с 30 по 180 дни после иммунизации) отмечали 100 % выживаемость иммунизированных *F. tularensis* 15 мышей после подкожного заражения животных *F. tularensis* 503 в дозе 1000 Dcl.

Таким образом, о наличии протективного иммунитета у мышей против заражения штаммом 503 *F. tularensis* subchp. *tularensis* свидетельствуют наличие специфических антител, способность клеток к усиленному синтезу ИФН- $\gamma$ , ИЛ-17, ИЛ-10 и увеличение количества активированных субпопуляций лимфоцитов CD19<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> в ответ на активацию клеток КНК.

На 30 сутки после иммунизации *F. tularensis* 15 у всех животных формировался протективный иммунитет, который обеспечивал 100 %-ную защиту мышей от туляремийной инфекции при подкожном пути введения бактерий *F. tularensis* Schu (1000 Dcl). Однако заражение мышей *F. tularensis* Schu на 60 сутки после иммунизации защищало 70 % животных от инфекции, на 90 сутки – 47 %, на 120, 150 и 180 – 20-27 %. Аналогичное снижение напряженности иммунитета выявили при интраназальном заражении мышей *F. tularensis* Schu.

Выраженное снижение напряженности иммунитета против заражения *F. tularensis* Schu (начиная со 120 суток после иммунизации мышей вакцинным штаммом) совпадало с исчезновением активации цитотоксических лимфоцитов, резким снижением активности синтеза цитокинов ИФН- $\gamma$ , ИЛ-10 и ИЛ-17, и пролиферативной активности лимфоцитов в ответ на реактивацию клеток КНК.

Таким образом, для формирования протективного иммунитета против заражения *F. tularensis* Schu необходимо участие цитотоксических лимфоцитов наряду с наличием специфических антител, ИФН- $\gamma$ , ИЛ-10, ИЛ-17, активированных Т хелперов и способностью усиливать пролиферативную активность лимфоцитов в ответ на антигены *F. tularensis*.

Наши данные согласуются с результатами других авторов [Wayne С. J., 2005; Metzger D. W., 2007; Jia Q., 2013]. Для подтверждения корреляции между выбранными нами показателями клеточного противотуляремийного иммунитета и напряженностью иммунитета мы проанализировали выраженность иммунологических показателей активации лимфоцитов под влиянием КНК у мышей, иммунизированных разными препаратами против туляремии и характеризующимися различной напряженностью иммунитета против заражения животных *F. tularensis* Schu. Мышей иммунизировали *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *F. tularensis* 15 $\Delta$ 23А – мутантным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ с делетированной копией гена *iglC* и инактивированным геном *гесА*. Иммунизация мышей дважды *F. tularensis* 15 $\Delta$ 23А обуславливала 100 % защиту животных от интраназального заражения *F. tularensis* Schu (таблица 2). Иммунизация мышей

*F. tularensis* 15Δ23A, а затем *F. tularensis* 15 НИИЭГ способствовала формированию протективного иммунитета против заражения *F. tularensis* Schu у 60 % животных. Однократная иммунизация животных *F. tularensis* 15Δ23A не была достаточной для формирования защиты от интраназального заражения *F. tularensis* Schu.

Таблица 2 – Концентрация цитокинов и процентное содержание CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> клеток, активированных тулярином, в культурах спленоцитов иммунизированных мышей\*

Иммунизация	Выживаемость, %	ИФН-γ, пкг/мл	ИЛ-17, пкг/мл	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> , %	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> , %
Интактные	0	10,78	н/о	1,26	1,12
<i>F. tularensis</i> 15Δ23, однократно	0	4,06	53,95	8,95	3,24
<i>F. tularensis</i> 15Δ23, дважды	100	<b>299,17</b>	<b>120,87</b>	<b>24,25</b>	<b>21,78</b>
<i>F. tularensis</i> 15Δ23, затем <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ	60	<b>55,67</b>	<b>158,04</b>	15,23	8,15

Примечание: \* n = 7. Жирным шрифтом указано достоверное увеличение показателей относительно данных группы интактных мышей.

Мы проанализировали уровни антител, изменение концентраций ИЛ-1, ИЛ-5, ИЛ-6, ИФН-γ, ФНО-α и ИЛ-17, количества CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> клеток, синтезирующих ФНО-α и ИФН-γ и экспрессирующих TLR-2, CD28, CD154, CD69 рецепторы, под влиянием тулярина в культурах спленоцитов от иммунизированных мышей.

Анализ полученных результатов позволил заключить, что напряженность иммунитета против интраназального заражения *F. tularensis* Schu коррелирует с наличием антител, усилением синтеза цитокинов ИФН-γ и ИЛ-17 и увеличением экспрессии CD69 рецептора CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> клетками в ответ на рестимуляцию спленоцитов тулярином или КНК.

Таким образом, в соответствии с полученными нами данными о наличии

клеточного противотуляремийного иммунитета можно судить на основании усиления синтеза цитокинов ИФН- $\gamma$  и ИЛ-17 и увеличения экспрессии CD69 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> клетками в ответ на рестимуляцию спленоцитов тулярином или КНК.

### **Оценка противотуляремийного иммунитета у людей, вакцинированных живой туляремийной вакциной**

У доноров, постоянно вакцинирующихся против особо опасных инфекций (в течение 15-20 лет), оценивали иммунный статус: содержание субпопуляций Т и В лимфоцитов, цитотоксических лимфоцитов, Т хелперов, натуральных киллеров и концентрации иммуноглобулинов (А, G, E). Отклонений от нормы не обнаружили.

У всех доноров на 28 сутки после иммунизации живой туляремийной вакциной были выявлены антитела к КНК и ЛПС *F. tularensis* в титрах 1:160-1:5120 и 1:400-1:5120, соответственно. Результаты реакций лейкоцитолита с тулярином были положительными и резко положительными у 40 % доноров. Низкий уровень положительных реакций лейкоцитолита позволил предположить, что для оценки клеточного противотуляремийного иммунитета у вакцинированных людей необходимо использовать другие методы.

Мы провели поиск маркеров клеток, отражающих специфическую активацию лимфоцитов в ответ на рестимуляцию антигенами *F. tularensis*. В процессе анализа изменения рецепторного состава лимфоцитов были выявлены разные пути активации Т лимфоцитов под влиянием тулярина или КНК у невакцинированных и вакцинированных против туляремии доноров. В крови, полученной от вакцинированных против туляремии людей, под влиянием тулярина увеличивалось количество В лимфоцитов, экспрессирующих CD86 ко-стимулирующий рецептор, что подразумевает одновременную активацию Т лимфоцитов. Об этом свидетельствует также обнаруженное нами увеличение CD3<sup>+</sup> субпопуляции, экспрессирующей CD28 рецептор (лиганд рецептора CD86) и CD154 рецепторы, под влиянием тулярина или КНК. Причем в крови у людей, иммунизированных живой туляремийной вакциной, происходило специфическое увеличение Т хелперов, экспрессирующих CD154 рецептор, под влиянием

тулярина ( $2,45 \pm 1,24$ ) или КНК ( $2,89 \pm 1,23$ ) по сравнению с количеством такой же субпопуляции, появляющейся под влиянием антигенов в крови невакцинированных доноров ( $0,54 \pm 0,08$ ) и ( $0,87 \pm 0,05$ ), соответственно). Лимфоциты неиммунных доноров активировались без участия CD154 рецептора. Активация Т лимфоцитов может индуцироваться через CD28 и/или CD154 рецепторы. При этом взаимодействие CD28-CD80/86 рецепторов приводит к активации клеточных реакций Т лимфоцитов, усилению пролиферативной активности, способствует распознаванию антигенов [Heninger A.K., 2014]. Взаимодействие CD154-CD40 рецепторов приводит к активации клеточных реакций Т лимфоцитов прежде всего по Th1 пути и способствует Т-зависимой продукции антител [Hollenbaugh D., 1992; Hou T.Z., 2015]. Таким образом, отсутствие усиления экспрессии CD154 рецептора на поверхности Т лимфоцитов неиммунных доноров свидетельствует об отсутствии активации Th1 пути иммунного ответа, что также подтверждается отсутствием синтеза ИФН- $\gamma$  лимфоцитами в ответ на антигены *F. tularensis*.

Важную роль в формировании постинфекционного и поствакцинального противотуляремийного иммунитета играют Т лимфоциты. При повторном проникновении *F. tularensis* в организм активируется субпопуляция Т-клеток памяти, экспрессирующих значительное количество рецептора CD45RO [Хаитов Р.М., 2000]. У вакцинированных против туляремии доноров под влиянием антигенов *F. tularensis* происходило специфическое увеличение Т хелперов памяти ( $CD3^+CD4^+CD45RO^+$ ), экспрессирующих HLA-DR рецептор (12,04 %), что свидетельствовало об активации клеток (рисунок 3).

Решающее значение для поддержания специфических Т лимфоцитов памяти имеет CD69 рецепторная молекула, которая действует как молекула ко-стимуляции Т-клеточной активации и пролиферации [Maskay L.K., 2015]. Под влиянием тулярина (рисунок 4) или КНК увеличивалось количество  $CD4^+CD69^+$  субпопуляций Т лимфоцитов, полученных от вакцинированных против туляремии людей, но не от интактных доноров.



Количество  $CD8^+CD69^+$  Т лимфоцитов под влиянием тулярина или КНК увеличивалось во всех образцах, полученных от иммунизированных против туляремии людей, и в 40 % случаев в образцах, полученных от доноров, ранее не вакцинированных против туляремии.

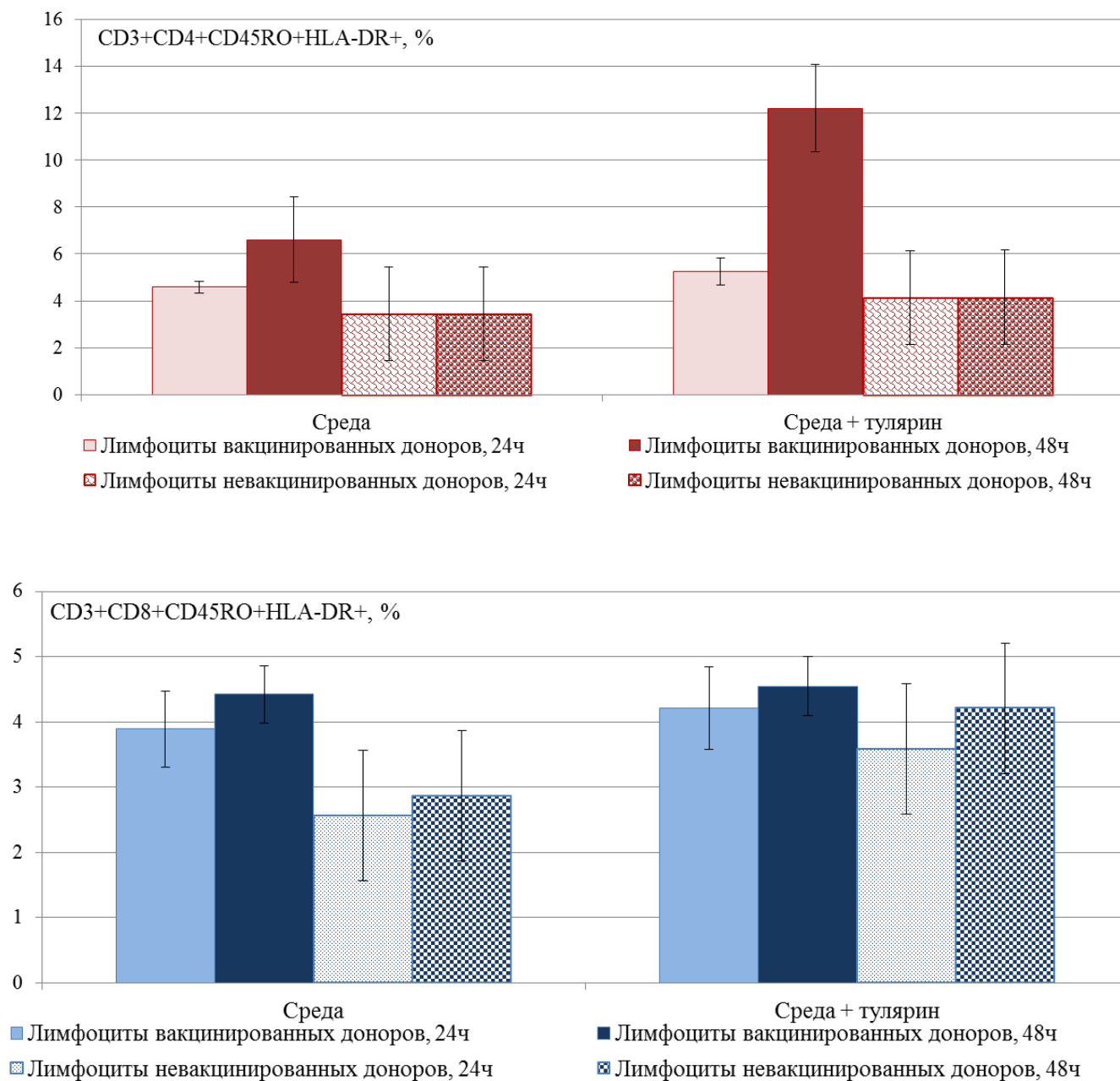
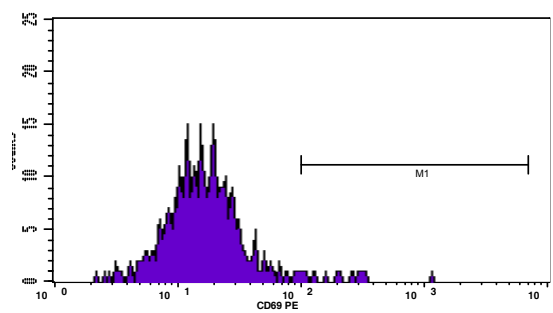
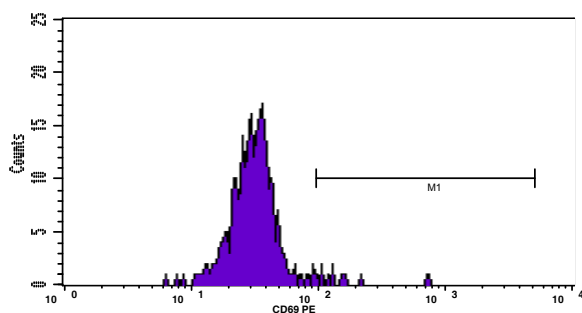


Рисунок 3 – Процентное содержание Т хелперов и цитотоксических лимфоцитов памяти, экспрессирующих HLA-DR рецепторную молекулу

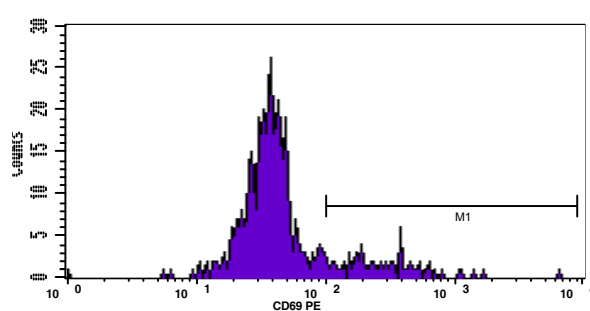
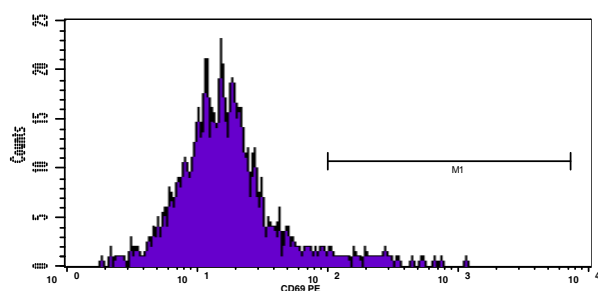
### Не вакцинированные доноры



Процент CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> лимфоцитов  
1,23 %

1,87 %

### Доноры, вакцинированные живой туляреминой вакциной



Процент CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> лимфоцитов  
2,51 %

10,11 %

Условия культивирования

Среда RPMI

Среда + тулярин

Рисунок 4 – Пример цитофлюорограмм, отражающих процентное содержание CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> лимфоцитов цельной крови не вакцинированных доноров и вакцинированных живой туляреминой вакциной людей без активации и после стимуляции *in vitro* тулярином

Примечание: Под отрезком M1 – находятся CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, в остальной части – CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD69<sup>-</sup> лимфоциты.

Сравнение изменения экспрессии CD107b, CD95, CD25 рецепторов на поверхности иммунокомпетентных клеток под влиянием антигенов *F. tularensis* в культурах, полученных от иммунных и контрольных доноров, не выявило достоверных различий между группами.

Традиционным методом оценки клеточного иммунитета является реакция бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ). Однако после иммунизации живой

туляремийной вакциной у ряда людей отмечается незначительное повышение индекса стимуляции (пролиферативной активности в ответ на рестимуляцию клеток антигенами *F. tularensis*) [Tärnvik A., 1985; Eneslätt K., 2011].

У некоторых постоянно вакцинирующихся против туляремии людей индекс стимуляции лимфоцитов через пять лет после последней иммунизации превышал значения индекса стимуляции лимфоцитов у контрольных доноров. У большинства доноров, сохранивших высокий индекс стимуляции после предыдущей вакцинации против туляремии, после очередной иммунизации живой туляремийной вакциной величина индекса стимуляции не изменялась. Цитометрический анализ показал, что пролиферативная активность под влиянием антигенов *F. tularensis* увеличивается за счет усиления пролиферативной активности в субпопуляции В лимфоцитов (таблица 3).

Таблица 3 – Процентное содержание пролиферирующих Т и В лимфоцитов\*

Группа доноров	Субпопуляция	Условия инкубации клеток		
		Среда	Среда + КНК	Среда + тулярин
Вакцинированные <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ	Т лимфоциты	4,56±1,14	4,51±1,5	4,85±1,54
	В лимфоциты	4,31±1,64	<b>8,62±3,14</b>	<b>7,41±3,98</b>
Невакцинированные	Т лимфоциты	3,45±1,45	4,12±1,47	3,21±1,21
	В лимфоциты	3,14±1,01	3,41±1,38	4,58±1,54

Примечание: \* – в группе вакцинированных доноров n = 45, в группе невакцинированных доноров n = 15. Жирным шрифтом указаны значения, достоверно отличающиеся от данных группы невакцинированных доноров.

Под влиянием КНК синтез ИЛ-17 и ИФН- $\gamma$  специфически усиливался в популяции лимфоцитов, полученных от вакцинированных против туляремии доноров (таблица 4). ИЛ-4 в культуральной жидкости лимфоцитов, как неактивированных, так и активированных антигенами туляремийного микроба, не выявлялся.

Таблица 4 – Содержание цитокинов в надосадочной жидкости культуры лимфоцитов, полученных от вакцинированных *F.tularensis* 15 НИИЭГ и невакцинированных доноров

Группа*	Условия инкубации	Концентрация цитокинов, пкг/мл		
		ИФН- $\gamma$	ИЛ-17	ИЛ-4
Доноры, вакцинированные <i>F.tularensis</i> 15 НИИЭГ	Среда	н/д	н/д	н/д
	Среда + тулярин	<b>&gt;1000</b>	<b>34,1<math>\pm</math>12,3</b>	н/д
	Среда + КНК	<b>&gt;1000</b>	<b>95<math>\pm</math>42,3</b>	н/д
Невакцинированные	Среда	н/д	н/д	н/д
	Среда + тулярин	50 $\pm$ 25,21	н/д	н/д
	Среда + КНК	н/д	н/д	н/д

Примечание: \* – в группе вакцинированных доноров  $n = 25$ , в группе невакцинированных доноров  $n = 10$ ; н/д – не детектируется. Жирным шрифтом указаны значения, достоверно отличающиеся от данных группы невакцинированных доноров.

Таким образом, для выявления противотуляремийного клеточного иммунитета у людей предложено оценивать изменение синтеза ИФН- $\gamma$  и ИЛ-17 лимфоцитами и/или усиление экспрессии CD69 рецептора на поверхности Т хелперов и HLA-DR маркера на поверхности CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> клеток в ответ на активацию лимфоцитов КНК.

#### **Оценка клеточного и гуморального иммунитета у мышей линии BALB/c после иммунизации коммерческой живой или экспериментальными чумными вакцинами**

Одними из первых клеточных структур, вступающих во взаимодействие с бактерией, являются толл-подобные рецепторы (TLR). Активация TLR способствует инициации иммунного ответа. В частности, усиление экспрессии TLR-2 рецептора способствует презентации антигена и поляризации иммунного ответа по Th1 типу [Basto A.P., 2014; Aliahmadi E, 2009]. Под влиянием УЗД *Y. pestis* и V антигена происходило усиление экспрессии TLR-2 на поверхности Т лимфоцитов и моноцитов, а под влиянием F1 – усиление экспрессии TLR-2 на поверхности моноцитов. В присутствии антигенов чумного микроба увеличивалось количество Т лимфоцитов и моноцитов, экспрессирующих TLR-9

рецептор, что было более выражено в группе иммунизированных против чумы мышей, по сравнению с интактными животными.

После взаимодействия TLR с рецепторами бактерий клетка активируется. Одним из показателей наличия специфического клеточного иммунитета является усиление пролиферативной активности лимфоцитов в ответ на реактивацию их антигеном. Под влиянием антигена F1 чумного микроба, лимфоциты, выделенные от мышей, иммунизированных *Y. pestis* EV или препаратом, содержащим F1 и V антигены *Y. pestis*, адсорбированные на гидроксиде алюминия, достоверно увеличивали пролиферативную активность ((9,33±1,67) % и (7,73±1,54) %, соответственно) (рисунок 5).

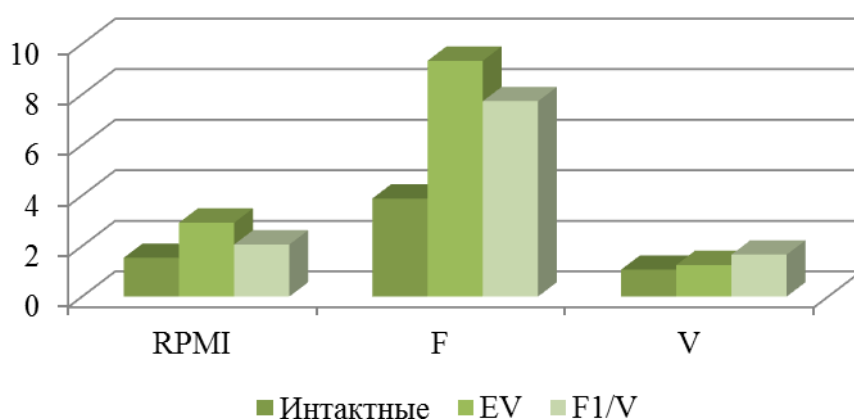


Рисунок 5 – Процентное содержание пролиферирующих лимфоцитов, выделенных от интактных и иммунизированных мышей (*Y. pestis* EV или препаратом, содержащим F1 и V антигены *Y. pestis*, адсорбированные на гидроксиде алюминия)

Примечание: Условия инкубирования лимфоцитов указаны по оси абсцисс: RPMI – в полной питательной среде, F – в среде в присутствии F1 антигена, V – в среде в присутствии V антигена чумного микроба. По оси ординат – процентное содержание пролиферирующих лимфоцитов.

Анализ пролиферативной активности отдельно Т и В лимфоцитов отразил особенности механизмов формирования противочумного иммунитета после иммунизации живой чумной вакциной и химической на основе F1 и V антигенов.

Лимфоциты, полученные от мышей, иммунизированных препаратом, содержащим F1 и V антигены, адсорбированные на гидроксиде алюминия, в присутствии F1 увеличивали пролиферативную активность за счет субпопуляции В лимфоцитов. Лимфоциты, полученные от мышей, иммунизированных *Y. pestis* EV НИИЭГ, усиливали пролиферативную активность лимфоцитов как за счет В субпопуляции, так и за счет Т субпопуляции.

Таким образом, данные пролиферативной активности лимфоцитов показывают, что после иммунизации живой чумной вакциной активируются и гуморальное и клеточное звено иммунитета, а после иммунизации препаратом, содержащим F1 и V антигены, адсорбированные на гидроксиде алюминия, формируется, прежде всего, гуморальный иммунный ответ.

Тем не менее анализ субпопуляций Т лимфоцитов показал, что под влиянием F1 антигена все же происходила специфическая активация цитотоксических лимфоцитов, полученных от мышей, иммунизированных как *Y. pestis* EV НИИЭГ, так и препаратом, содержащим F1 и V антигены, адсорбированные на гидроксиде алюминия (рисунок 6). Об этом свидетельствовало усиление экспрессии CD69 рецептора на поверхности лимфоцитов, что отражает начальную стадию активации клетки [Maskay L.K., 2015]. Менее выражено под влиянием F1 антигена активировались Т хелперы, полученные от мышей, иммунизированных против чумы (рисунок 6).

Клеточно-опосредованный противочумный иммунный ответ основывается на развитии иммунного ответа по Th1 пути, который характеризуется появлением патоген-специфических Т лимфоцитов, синтезирующих ИФН- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$  [Philipovskiy A.V., 2007; Do Y., 2012]. Большая роль в усилении бактерицидной активности макрофагов кроме ИФН- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$  [Lukaszewski R.A., 2005] принадлежит ИЛ-17 [Lin Y., 2009; O'Connor W.Jr., 2010], который играет особо важную роль при формировании мукозального противочумного иммунитета [Jr-Shiuan Lin, 2011]. Даже при высоких титрах антител к антигенам *Y. pestis*, но при низкой активности синтеза цитокинов ИФН- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ , ИЛ-17 в ответ на заражение вирулентным штаммом чумы, мыши погибают [Elvin S.J., 2004;

Parent M.A., 2005]. Спленциты, полученные от мышей, иммунизированных против чумы, в отличие от интактных животных в присутствии антигенов *Y. pestis* значительно усиливали синтез ИФН- $\gamma$  и ИЛ-17 (рисунок 7).

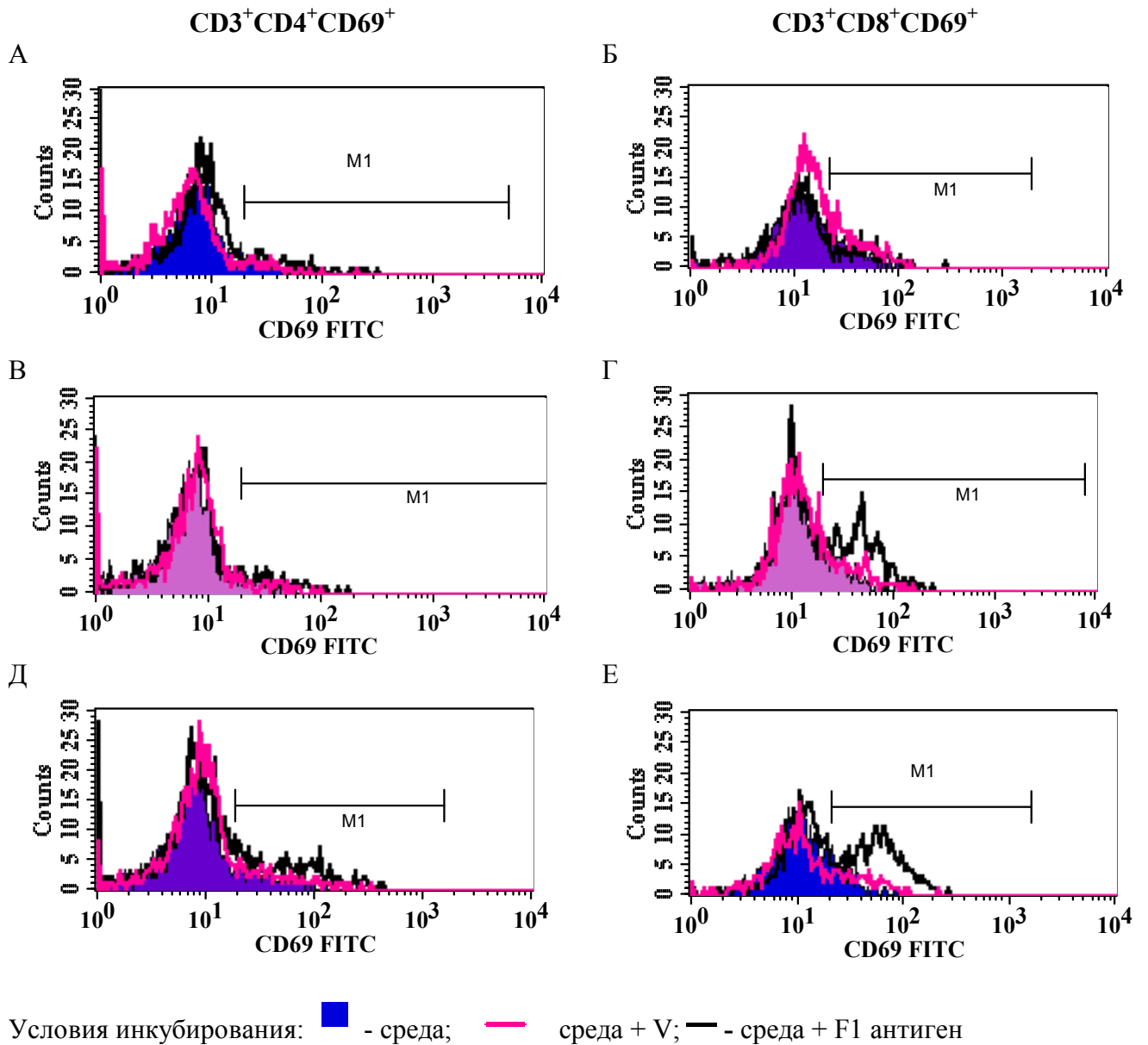


Рисунок 6 – Изменение экспрессии CD69 рецептора на поверхности Т хелперов (А, В, Д) и цитотоксических лимфоцитов (Б, Г, Е) интактных мышей (А, Б), мышей иммунизированных препаратом на основе F1 и V антигенов, содержащим гидроксид алюминия (В, Г) или *Y. pestis* EV НИИЭГ (Д, Е) под влиянием антигенов чумного микроба

Примечание: CD69-позитивные лимфоциты расположены под отрезком M1.

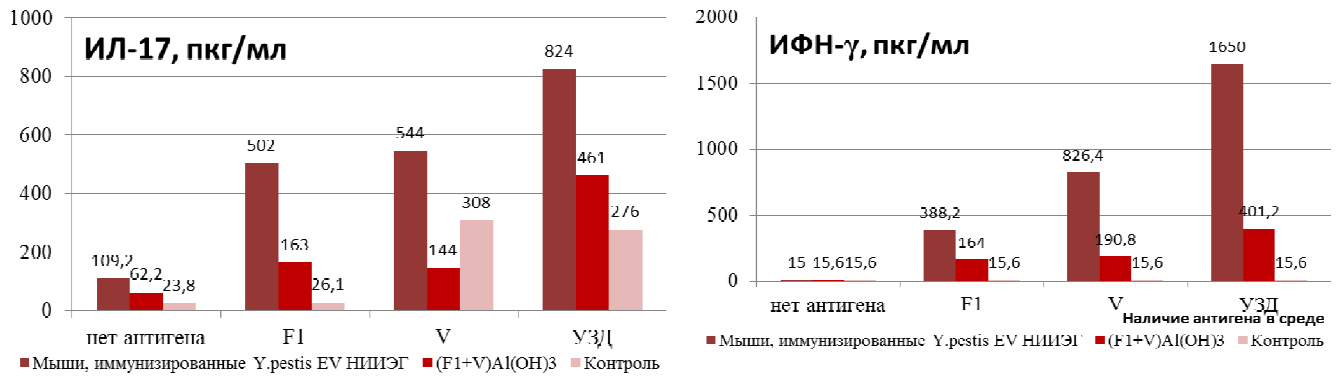


Рисунок 7 – Изменение концентрации ИЛ-17 и ИФН-γ в среде культивирования спленоцитов, полученных от интактных и иммунизированных мышей, в присутствии антигенов *Y. pestis* и без них

Причем концентрация ИФН-γ и ИЛ-17 была выше в 2-4 раза в супернатанте культуры активированных антигенами спленоцитов, полученных от мышей, иммунизированных *Y. pestis* EV НИИЭГ, по сравнению с количеством этих цитокинов в культуральной жидкости активированных спленоцитов, полученных от мышей, иммунизированных препаратом на основе F1 и V антигенов чумного микроба, содержащим гидроксид алюминия.

Добавление в среду культивирования антигенов *Y. pestis* приводило к усилению синтеза провоспалительных цитокинов ИЛ-10, ИЛ-6, ФНО-α в культурах спленоцитов, выделенных и от интактных и от иммунизированных против чумы мышей. Уровень синтеза ИЛ-4 в присутствии антигенов чумного микроба достоверно не изменялся.

По некоторым данным [Parent M.A., 2005; Amedei A., 2011; Szaba F.M., 2014], активация именно субпопуляции CD8<sup>+</sup> лимфоцитов и синтез ими цитокинов ИФН-γ и ФНО-α необходимы для формирования протективного иммунитета против заражения чумой. Мы проанализировали уровень синтеза цитокинов отдельными субпопуляциями клеток. В культурах спленоцитов, полученных от мышей, иммунизированных *Y. pestis* EV НИИЭГ или препаратом, содержащим F1 и V антигены, адсорбированные на гидроксиде алюминия, в присутствии антигенов чумного микроба происходило специфическое усиление



синтеза ИФН- $\gamma$  CD8<sup>+</sup> лимфоцитами (таблица 5). CD8<sup>+</sup> лимфоциты интактных мышей не усиливали синтез ИФН- $\gamma$  под влиянием антигенов чумного микроба.

Таблица 5 – Процентное содержание лимфоцитов, синтезирующих ИФН- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$  или ИЛ-4

Группа мышей*	Условия инкубирования	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> ИФН- $\gamma$ <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> ИФН- $\gamma$ <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> ИФН- $\gamma$ <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> ФНО- $\alpha$ <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> ИЛ-4 <sup>+</sup>
Интактные	Среда	1,96 ± 0,46	1,67 ± 0,67	2,25 ± 0,98	5,18 ± 1,09	1,01 ± 0,09
	УЗД	2,16 ± 0,87	10,45±3,25	12,41±3,26	25,31 ± 3,25	11,61 ± 1,23
	F1	1,56 ± 0,41	7,79 ± 2,15	9,55 ± 2,03	21,19 ± 2,15	13,66 ± 2,25
	V	2,84 ± 1,02	11,26±2,10	13,29±2,11	3,33 ± 0,15	4,22 ± 0,12
Иммунизированные Y.pestis EV НИИЭГ	Среда	1,35 ± 0,51	2,7 ± 0,15	2,95 ± 0,31	6,14 ± 2,01	1,55 ± 0,35
	УЗД	<b>5,33 ± 0,93</b>	<b>27,14±3,58</b>	<b>31,4 ± 3,58</b>	27,15 ± 3,26	9,53 ± 2,21
	F1	<b>7,31 ± 1,23</b>	<b>30,3 ± 6,25</b>	<b>37,83±7,15</b>	28,96 ± 1,02	11,01 ± 3,01
	V	<b>4,72 ± 0,72</b>	14,86±2,54	15,45±3,26	5,41 ± 0,85	4,31 ± 0,45
Иммунизированные F1+V+ Al(OH) <sub>3</sub>	Среда	1,48 ± 0,74	2,9 ± 0,33	1,4 ± 0,11	3,16 ± 0,36	1,55 ± 0,02
	УЗД	<b>5,9 ± 0,54</b>	<b>19,94±4,47</b>	<b>27,43±4,15</b>	<b>45,15 ± 5,14</b>	11,89 ± 1,21
	F1	<b>4,9 ± 0,84</b>	<b>14,39±3,25</b>	<b>16,06±4,44</b>	<b>41,48 ± 7,54</b>	3,58 ± 0,54
	V	<b>6,92 ± 1,21</b>	<b>25,9 ± 4,32</b>	<b>30,41 ± 5,5</b>	<b>19,81 ± 3,26</b>	3,25 ± 0,89

Примечание: \* n = 10. Жирным шрифтом указаны значения, достоверно отличающиеся от данных клеточной культуры интактных мышей, инкубированных при тех же условиях.

T лимфоциты способны активировать B лимфоциты за счет межрецепторных взаимодействий [Riha P., 2010]. CD28 рецептор, экспрессирующийся на T лимфоцитах, взаимодействуя с CD80 и CD86 рецепторными молекулами на поверхности B лимфоцитов, запускает дифференцировку иммунного ответа по Th2 пути и способствует формированию герминтативных центров B лимфоцитов и переключению изотипов иммуноглобулинов [Tanaka H., 2015]. У иммунных животных активация лимфоцитов может идти по CD28-независимому пути [Berg M., 2008] за счет взаимодействия рецепторов B лимфоцитов с индуцибельной мембранной молекулой CD154 [Zheng J., 2013], которая способствует развитию иммунного ответа по Th1 пути [Kishimoto K., 2000]. Мы выявили разные пути

Т-опосредованной активации В лимфоцитов, полученных от интактных и иммунных мышей, под влиянием F1 антигена. В группе мышей, иммунизированных против чумы, под влиянием F1 или V антигенов происходило снижение экспрессии CD28 на поверхности Т лимфоцитов за счет CD8<sup>+</sup> субпопуляции, а в группе интактных животных – увеличение CD28 рецептора на поверхности лимфоцитов (таблица 6). Одновременно экспрессия CD154 рецепторной молекулы под влиянием F1 антигена усиливалась на поверхности Т лимфоцитов, полученных от иммунных мышей, в отличие от лимфоцитов интактных животных.

Таблица 6 – Процентное содержание лимфоцитов, экспрессирующих CD28 и CD154 рецепторы

Группа мышей*	Условия инкубирования	Процентное содержание, %					
		CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup>
Интактные	Среда	20,78	4,49	12,32	13,21	9,12	17,54
	Среда + F1	<b>25,88</b>	5,15	<b>18,84</b>	12,58	10,14	20,15
	Среда + V	16,38	5,4	12,21	13,02	9,24	20,22
Иммунизированные <i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ	Среда	25,04	5,15	15,68	13,11	8,35	19,58
	Среда + F1	14,88	4,15	9,84	<b>23,25</b>	<b>21,48</b>	<b>40,65</b>
	Среда + V	17,96	3,52	10,07	12,5	8,78	21,25
Иммунизированные F1+V+Al(OH) <sub>3</sub>	Среда	21,12	3,6	11,71	12,48	11,07	18,47
	Среда + F1	14,67	3,05	8,53	<b>18,45</b>	<b>17,58</b>	<b>35,21</b>
	Среда + V	17,21	2,45	9,10	11,58	12,45	20,65

Примечание: Жирным шрифтом указаны субпопуляции лимфоцитов, достоверно увеличивающиеся под влиянием антигенов.

Активация В лимфоцитов сопряжена с появлением на их поверхности CD69 и CD86 рецепторов, усилением пролиферативной активности и дальнейшим синтезом ими специфических антител. В ответ на стимуляцию антигенами чумного микроба происходило появление активационных молекул CD69 и CD86

на поверхности CD19<sup>+</sup> В лимфоцитов, полученных от интактных и иммунизированных против чумы мышей, что свидетельствует об одинаковом начальном пути активации В лимфоцитов не зависимо от наличия или отсутствия клеток памяти.

Мы проанализировали напряженность иммунитета у мышей против подкожного заражения *Y. pestis* 231 и специфические иммунологические показатели (таблица 7).

Сравнительный анализ иммунологических показателей противочумного иммунитета у мышей, иммунизированных живой чумной вакциной и химическими препаратами против чумы, показал некоторые различия. Все препараты индуцировали формирование антител к F1 и/или V антигену.

У мышей, иммунизированных *Y. pestis* EV НИИЭГ или препаратом на основе V и F1 антигенов, сорбированных на гидроксиде алюминия, отмечали усиление пролиферативной активности В лимфоцитов, увеличение синтеза ИЛ-17 и ИФН- $\gamma$  спленоцитами, повышение количества CD22<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> клеток, увеличение синтеза ИФН- $\gamma$  и экспрессии CD69 и CD154 маркеров в субпопуляции цитотоксических лимфоцитов под влиянием F1 антигена. После иммунизации живой чумной вакциной реактивация лимфоцитов F1 антигеном приводила кроме того к увеличению пролиферативной активности Т лимфоцитов, более выраженному увеличению синтеза ИФН- $\gamma$  и экспрессии CD69 маркера в субпопуляции цитотоксических лимфоцитов и увеличению CD19<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> В лимфоцитов.

Таким образом, о наличии клеточного противочумного иммунитета свидетельствует специфическое увеличение синтеза ИЛ-17 и ИФН- $\gamma$  лимфоцитами, усиление экспрессии CD69 и CD154 маркеров в субпопуляции цитотоксических лимфоцитов под влиянием F1 антигена.

Таблица 7 – Сравнительная оценка напряженности поствакцинального противочумного иммунитета и индексов активации клеток под влиянием F1 антигена в реакциях *in vitro*

Группа мышей*	LD <sub>50</sub> , КОЕ	ИИ	Титры антител (разведение сывороток)		Пролиферативная активность, ИА		Цитокины, ИА		ИА В лимфоцитов		Экспрессия CD69 рецептора, ИА	
			F1	V	CD19 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup>	ИЛ-17	ИФН-γ	CD19 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	CD22 <sup>+</sup> CD86 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>
Интактные	1 (0,1 - 1,4)**	1	н/о	н/о	1,50	1,22	1,10	1,00	2,94	8,01	1,1	4,09
Иммунизированные Al(OH) <sub>3</sub>	1 (0,1 – 2)**	1	н/о	н/о	1,85	1,35	1,54	3,00	2,55	2,98	1,25	4,15
Иммунизированные V + Al(OH) <sub>3</sub>	222 (56- 885)**	222	-	<b>5×10<sup>-6</sup></b>	1,65	1,33	1,45	1,25	2,11	3,02	1,35	4,58
Иммунизированные F1 + Al(OH) <sub>3</sub>	2224 (558 - 88544)**	2224	<b>10<sup>-4</sup></b>	-	1,95	1,34	1,23	3,54	2,45	5,45	1,59	<b>8,54</b>
Иммунизированные F1 + V + Al(OH) <sub>3</sub>	22241 (7033 - 88543)**	22241	<b>2×10<sup>-5</sup></b>	<b>5×10<sup>-6</sup></b>	<b>2,88</b>	1,31	<b>2,62</b>	<b>10,51</b>	1,85	<b>12,22</b>	<b>2,18</b>	<b>11,57</b>
Иммунизированные <i>Y.pestis</i> EV НИИЭГ	22241 (7033 - 88543)**	22241	<b>2×10<sup>-3</sup></b>	н/о	<b>6,07</b>	<b>6,48</b>	<b>4,60</b>	<b>25,88</b>	<b>3,07</b>	<b>17,28</b>	<b>2,83</b>	<b>32,52</b>

Примечание – ИИ – индекс иммунитета; ИА – индекс активации (соотношение показателя культуры стимулированных F1 антигеном клеток по отношению к показателю культуры клеток, не стимулированных антигеном); н/о – не обнаружены; \* n = 10; \*\* пределы колебаний LD<sub>50</sub>. Жирным шрифтом указаны значения, достоверно превышающие данные интактных мышей.

## Оценка клеточного и гуморального иммунного ответа у людей после иммунизации живой чумной вакциной

Уровни антител к F1 *Y. pestis* в сыворотках крови людей, постоянно вакцинирующихся против чумы (около 30 лет), через месяц после иммунизации живой чумной вакциной, колебались в пределах 1:100-1:1600. У четверых из 12 контрольных доноров обнаруживали антитела к F1 антигену чумного микроба в титрах от 1:100 до 1:400, что позволяет предположить перекрестные реакции антител к F1 антигену чумного микроба с антигенами других микробов.

Протективный противочумный иммунитет подразумевает наличие антител против не только F1, но также и против V антигена [Sabhnani L., 2003; Williamson E.D., 2013]. В частности, высокие титры антител против F1 и V антигенов в сыворотке крови мышей коррелируют с выживаемостью животных после заражения их вирулентным штаммом *Y. pestis* [Williamson E.D., 1999]. Результаты наших исследований показали, что антитела к V антигену выявляются в сыворотках иммунизированных живой чумной вакциной людей в титрах от 1:100 до 1:800. Анализ сывороток контрольных доноров показал, что у троих контрольных доноров титры антител к V антигену колебались в пределах 1:400 и 1:800 (таблица 8).

Таблица 8 – Титры антител к V антигену в сыворотках крови, полученных от доноров, иммунизированных живой чумной вакциной и невакцинированных людей

Количество человек в группе	Процент доноров имеющих антитела к V антигену					
	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600
22 вакцинированных донора	4,55	9,09	22,73	36,36	13,64	13,64
12 невакцинированных доноров	36,36	27,27	9,09	9,09	18,18	-

Таким образом, как к F1, так и к V антигену *Y. pestis* могут выявляться перекрестные реакции в сыворотке крови у людей. *Y. pestis* принадлежит к роду *Yersinia*. Этим объясняются перекрестные реакции антигенов *Y. pestis* с антигенами других бактерий рода *Yersinia* (*Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*)



Результаты наших исследований показали, что под влиянием УЗД или F1 *Y. pestis*, но не V или Pla антигенов чумного микроба, происходило увеличение численности В лимфоцитов, экспрессирующих маркер ранней активации CD69. Однако активация В лимфоцитов под влиянием F1 и УЗД *Y. pestis* не являлась специфической, так как мы выявили усиление экспрессии CD69 рецептора на поверхности В лимфоцитов и в культуре клеток, полученных от невакцинированных доноров.

В лимфоциты принимают участие в активации Т лимфоцитов, способствуя формированию клеточного ответа [Mitchison N.A., 2014]. Взаимодействие Т и В-клеток происходит через CD86 или CD80 рецептор на поверхности В лимфоцитов, что определяет дальнейшую функциональную активность Т лимфоцитов. CD86 молекула имеет большую avidность к CD28 рецептору, взаимодействие с которым приводит к активации CD4<sup>+</sup> Т лимфоцитов. CD80 характеризуется большей avidностью к CTLA-4 молекуле, взаимодействие с которой приводит к снижению функциональной активности Т лимфоцитов [Good-Jacobson K.L., 2012]. Под влиянием F1 антигена происходило усиление экспрессии CD86, но не CD80 рецептора, на поверхности В лимфоцитов, что позволяет заключить об активации не только В лимфоцитов, но и CD4<sup>+</sup> Т лимфоцитов. Данные литературы также подтверждают, что F1 антиген индуцирует формирование не только гуморального иммунного ответа, но и клеточного, о чем свидетельствует выработка иммуноглобулинов подклассов G1 и G2a в ответ на иммунизацию экспериментальных животных антигеном F1 [Taue K.J., 2010]. Уровень экспрессии CD86 рецептора на поверхности В лимфоцитов в присутствии F1 антигена чумного микроба был более выраженным в группе доноров, иммунизированных живой чумной вакциной, по сравнению с В лимфоцитами, выделенными от невакцинированных людей.

Под влиянием антигена F1 происходило увеличение пула CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> клеток, полученных как от вакцинированных против чумы людей, так и от контрольных доноров.

Сравнительный анализ изменения экспрессии CD95, CD107b рецепторов под влиянием F1, Pla или V антигенов чумного микроба, между клетками, полученными от контрольных и вакцинированных против чумы доноров, не выявил достоверных различий.

Наличие иммунитета сопряжено с присутствием клеток памяти (CD45RO<sup>+</sup>), которые активируются при повторном проникновении возбудителя в организм. Оценку активации клеток проводили на основе выявления HLA-DR – позднего маркера активации клеток. Результаты исследований показали, что под влиянием F1 антигена *Y. pestis* количество CD45RO<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> Т лимфоцитов памяти увеличивалось в крови, полученной от вакцинированных против чумы людей, но не от контрольных доноров (таблица 9).

Таблица 9 – Изменение процентного содержания активированных (HLA-DR<sup>+</sup>) субпопуляций лимфоцитов памяти (CD45RO<sup>+</sup>), полученных от иммунизированных живой чумной вакциной и невакцинированных доноров, под влиянием F1 антигена *Y. pestis* в условиях *in vitro*

Группа доноров	Условия инкубации	Процентное содержание субпопуляции*, %		
		CD3+ CD45RO+ HLA-DR+	CD3+CD4+ CD45RO+ HLA-DR+	CD3+CD8+ CD45RO+ HLA-DR+
Иммунизированные живой чумной вакциной	Среда	3,33±2,13	1,43±0,84	1,70±0,79
	Среда +F1	<b>9,86±3,08</b>	<b>5,67±1,74</b>	<b>4,77±1,56</b>
Невакцинированные	Среда	0,46±0,14	0,39±0,23	0,51±0,14
	Среда +F1	0,94±0,62	0,45±0,24	0,85±0,50

Примечание : \* – в группе вакцинированных доноров n = 15, в группе невакцинированных доноров n = 10. Жирным шрифтом указаны значения, достоверно отличающиеся от данных клеточной культуры невакцинированных доноров, инкубировавшихся при тех же условиях.

Сравнение изменений синтеза ИФН-γ, ИЛ-17 и ИЛ-4 лимфоцитами, полученными от контрольных и иммунных доноров, под влиянием F1 антигена чумного микроба не показали достоверных различий между анализируемыми группами.



Таким образом, у первично вакцинируемых против чумы людей перед иммунизацией необходимо определять уровень антител к F1 антигену, чтобы исключить ложноположительные результаты. У постоянно прививающихся против чумы людей титры антител к F1 антигену *Y. pestis* могут быть низкими. О наличии клеточного противочумного иммунитета можно судить по увеличению количества CD45RO<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> Т лимфоцитов под влиянием F1 антигена *Y. pestis*.

### **Оценка клеточного и гуморального иммунного ответа после иммунизации против сибирской язвы**

На модели морских свинок и мышей проводили оценку клеточного иммунитета с использованием антраксина в реакции *in vitro*. Аналогично реакции лейкоцитолита с тулярином оценивали уровень гибели клеток под влиянием антраксина между группами животных, вакцинированных и невакцинированных против сибирской язвы. Было показано, что через 2 ч инкубирования с антракисном клеток, полученных от иммунных мышей, не происходило гибели лейкоцитов. Исследования направленные на изучение состояния ядерного хроматина и содержания азурофильных лизосомальных гранул, несущих активность эластазы и миелопероксидазы, выявили, что у мышей, иммунизированных *B. anthracis* СТИ-1, отмечалось специфическое увеличение гиподиплоидных клеток и активация РНК под влиянием антраксина.

Использование данного метода на лимфоцитах, полученных от вакцинированных против сибирской язвы доноров, позволило выявить положительные реакции не у всех людей. Попытка оценить клеточный иммунитет против сибирской язвы с использованием антраксина или протективного антигена по усилению экспрессии CD69 рецептора на поверхности Т лимфоцитов не показала достоверных различий между вакцинированными против сибирской язвы людьми и неиммунными донорами. Уровни изменения экспрессии CD69 рецептора на поверхности Т лимфоцитов, синтеза РНК, количества гиподиплоидных клеток под влиянием антраксина или протективного антигена характеризовались индивидуальными различиями между донорами не зависимо от наличия специфического иммунитета.

## ВЫВОДЫ

1. Усиление экспрессии CD69 рецептора на поверхности Т лимфоцитов, синтеза ИФН- $\gamma$  и ИЛ-17 спленоцитами в ответ на реактивацию кислото-нерастворимым комплексом, а также наличие антител к липополисахариду и кислото-нерастворимому комплексу *F. tularensis* коррелируют с наличием протективного иммунитета у мышей против подкожного заражения бактериями *F. tularensis* 503 (subsp. *holarctica*).

2. Для формирования протективного иммунитета у мышей против заражения более вирулентными (по сравнению с *F. tularensis* 503 subsp. *holarctica*) бактериями *F. tularensis* Schu (subsp. *tularensis*) необходимо участие не только специфических антител, ИФН- $\gamma$ , ИЛ-17 и Т хелперов, но также активация цитотоксических лимфоцитов. В реакциях *in vitro* увеличение процентного содержания CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> субпопуляций и усиление синтеза ИФН- $\gamma$  и ИЛ-17 под влиянием тулярина и кислото-нерастворимого комплекса *F. tularensis* коррелируют с защитой мышей от заражения *F. tularensis* Schu.

3. На протяжении шести месяцев после иммунизации мышей *F. tularensis* 15 животные были полностью защищены от подкожного заражения бактериями *F. tularensis* 503, что коррелировало с наличием антител к липополисахариду и кислото-нерастворимому комплексу *F. tularensis*, усилением экспрессии CD69 рецептора на поверхности Т лимфоцитов, синтезом ИФН- $\gamma$  и ИЛ-17 спленоцитами в ответ на активацию клеток кислото-нерастворимым комплексом. 100 %-ная и 75 %-ная защита животных от подкожного и аэрозольного заражения, соответственно, бактериями высоковирулентного штамма *F. tularensis* Schu была выявлена только на ранних сроках после иммунизации мышей *F. tularensis* 15 (30-е сутки) с последующим снижением протективного иммунитета. Снижение протективного иммунитета у мышей коррелировало с снижением активности синтеза ИФН- $\gamma$ , ИЛ-17 и отсутствием увеличения CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> субпопуляции и пролиферативной активности лимфоцитов под влиянием кислото-нерастворимого комплекса *in vitro*.

4. В зависимости от степени воспаления, регистрируемого по уровню падения веса и изменению цитокиновой активности, у мышей наблюдается усиление (при низких дозах иммунизации) или подавление (при дозе 135 КОЕ/мышь) клеточных реакций *in vitro* на кислото-нерастворимый комплекс, а уровень гуморального ответа – усиливается по мере увеличения иммунизирующей дозы.

5. По изменению количества клеток, экспрессирующих CD69 рецептор на поверхности Т хелперов и HLA-DR маркер на поверхности CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> клеток, под влиянием тулярина, можно судить о наличии противотулярийного клеточного иммунитета у людей.

6. Усиление пролиферативной активности В лимфоцитов, синтеза ИЛ-17, количества CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> субпопуляций, экспрессирующих CD69 и CD154 рецепторы, в ответ на активацию спленоцитов *in vitro* F1 антигеном *Y. pestis* отражает наличие клеточного противочумного иммунитета. Антигены V, Pla и ультразвуковой дезинтеграт *Y. pestis* не вызывают специфических изменений функциональной активности лимфоцитов, полученных от мышей, иммунизированных против чумы.

7. Активация Т лимфоцитов под влиянием тулярина или кислото-нерастворимого комплекса у вакцинированных против туляремии доноров инициируется через CD28 и CD154 рецепторные молекулы. Лимфоциты неиммунных доноров активируются без участия CD154, что свидетельствует об ингибировании Th1 иммунного ответа. В крови, полученной от доноров, иммунизированных живой чумной вакциной, под влиянием F1 антигена на поверхности В лимфоцитов происходит усиление экспрессии CD86, что способствует активации Т лимфоцитов.

8. По увеличению экспрессии маркера поздней активации HLA-DR под влиянием F1 антигена *Y. pestis* на поверхности CD45RO<sup>+</sup> лимфоцитов можно судить о наличии противочумного клеточного иммунитета у людей.

9. Иммунный статус у людей, постоянно вакцинирующихся против чумы, туляремии и сибирской язвы, находится в пределах нормальных показателей.

10. Для выявления клеточного иммунитета против *B. anthracis* необходимо продолжить поиск маркеров.

**Список сокращений**

**ИА** – индекс активации

**ИИ** – индекс иммунитета

**ИЛ** – интерлейкин

**ИФА** – иммуноферментный анализ

**ИФН- $\gamma$**  – интерферон гамма

**КНК** – кислотонерастворимый комплекс *F. tularensis*

**КОЕ** – колониеобразующая единица

**ЛПС** – липополисахарид

**п.к.** – подкожно

**РБТЛ** – реакция бласттрансформации лимфоцитов

**УЗД** – ультразвуковой дезинтегратор

**ФНО- $\alpha$**  – фактор некроза опухоли альфа

**CD** – кластер дифференцировки

**F1** – Ф1 антиген *Y. pestis*

**HLA-DR** – главный комплекс гистосовместимости

**LF** – летальный фактор

**РА** – протективный антиген

**Pla** – активатор плазминогена *Y. pestis*

**Th1** – Т хелперы 1-го типа

**Th2** – Т хелперы 2-го типа

**TLRs** – толл-подобные рецепторы

**V** – Ви антиген *Y. pestis*

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

## а) статьи в рецензируемых научных журналах

1. Микшис, Н.И. Иммунологическая эффективность генетически сконструированных бациллярных штаммов, продуцирующих протективный антиген сибирезязвенного микроба / Н.И. Микшис, О.М. Кудрявцева, М.Ф. Болотникова, Л.В. Новикова, Ю.А. Попов, И.Г. Дроздов, Т.Н. Щуковская, **В.В. Фирстова**, С.Н. Ключева // Проблемы особо опасных инфекций. – 2005, № 2(90). – С. 58-59.
2. Щуковская, Т.Н. Оценка приобретенного иммунитета против сибирской язвы по степени повреждения лейкоцитов крови *in vitro* антраксином / Т.Н. Щуковская, **В.В. Фирстова**, А.Л. Кравцов, С.Н. Ключева, Ю.А. Попов, Н.И. Микшис // Проблемы особо опасных инфекций. 2007. – № 1(93). – С. 81-84.
3. **Firstova, V.V.** Evaluation of antitularemia immunity via whole human blood leukocyte cytofluorometric analysis / **V.V. Firstova**, A.L. Kravtsov, T.P. Schmelkova, T.N. Shchukovskaya // Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering. – 2005. – N 5771. – С. 311-315.
4. Волох, О.А. Оценка иммунобиологической активности препаратов С-комплекса возбудителя туляремии как перспективного компонента химических вакцин / О.А. Волох, И.А. Шепелев, **В.В. Фирстова**, Е.М. Храмова, И.Г. Авдеева, Ю.И. Самохвалова, С.А. Еремин, И.А. Дятлов, В.Е. Жемчугов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2007. – № 3. – С. 16-21.
5. **Фирстова, В.В.** Определение экспрессии CD69 на лимфоцитах мышей иммунизированных против чумы в ответ на стимуляцию антигенами чумного микроба / **В.В. Фирстова**, И.В. Бахтеева, Г.М. Титарева, Е.Ю. Зырина, С.А. Иванов, А.П. Анисимов // Медицинская иммунология. – 2009. – Т. 11, № 4-5. – С. 336-337.
6. **Фирстова, В.В.** Определение экспрессии маркера ранней активации CD69 на лимфоцитах иммунных мышей после стимуляции их антигенами чумного микроба / **В.В. Фирстова**, И.В. Бахтеева, Г.М. Титарева, Е.В. Зырина, С.А. Иванов, Н.В. Киселева, П.Х. Копылов, А.П. Анисимов, И.А. Дятлов // Проблемы особо опасных инфекций. – 2010. – № 1 (103). – С. 56-59.
7. Говорунова, В.А. Исследование взаимодействия бромистого этидия с клетками бактерий рода *Yersinia* в лиофилизированных/ регидратированных препаратах / В.А. Говорунова, И.Г. Говорунов, **В.В. Фирстова**, Е.В. Зырина // Проблемы особо опасных инфекций. – 2012. – № 1 (111). – С. 54-56.
8. **Фирстова, В.В.** Оценка клеточного и гуморального поствакцинального специфического иммунитета у людей, регулярно вакцинирующихся по профилактическим показаниям против туляремии / **В.В. Фирстова**, Т.Б. Кравченко, Е.В. Зырина, И.В. Бахтеева, Г.В. Титарева, Е.А. Тюрин, И.А. Дятлов // Жизнь без опасностей. – 2012. – Т. 7, № 2. – С.96-102.
9. The *in vitro* evaluation of anti-plague cellular immunity by quantitative analysis of IFN- $\gamma$  synthesis and the appearance of activation molecules on the surface of

T-helper cells/ *Advances in Yersinia Research* / Alzira Maria Paiva de Almedia, Nilma Cintra Leal // *Advances in experimental medicine and biology.*– Springer Science. Business Media New York, 2012. – Vol. 954, Part 4. – P. 173-177.

10. **Фирстова, В.В.** Изменение эффекторной активности Т-лимфоцитов мышей, иммунизированных против туляремии, при стимуляции *in vitro* тулярином / **В.В. Фирстова**, В.М. Павлов, Т.Б. Кравченко, Е.В. Зырина, А.И. Борзилов, А.И. Дятлов // *Проблемы особо опасных инфекций* – 2012. – № 4 (14). – С.73-76.

11. **Firstova, V.V.** Immunological Markers that Correlate with Protection Immunity Against Tularemia Infection / **V.V. Firstova**, A.N. Mokrievich, V.M. Pavlov, A.A. Gorbato, S.F. Biketov, I.A. Dyatlov // *Advances in Experimental Medicine and Biology.* – 2014, N 808. – P. 15-23.

12. **Фирстова, В.В.** Влияние степени воспаления у мышей линии balb/c, индуцированного разными дозами *F.tularensis* 15 НИИЭГ, на формирование антитуляремийного клеточного и гуморального иммунного ответа / **В.В. Фирстова**, В.М. Павлов, А.А. Горбатов, Т.И. Комбарова, А.В. Караулов, И.А. Дятлов // *Иммунология.* – 2014, № 35 (3). – С. 147-150.

13. Дятлов, И.А. Комплексная оценка безопасности наноматериалов для здоровья человека и среды его обитания / И.А. Дятлов, В.П. Холоденко, В.Д. Потапов, **В.В. Фирстова**, В.А. Чугунов, В.Н. Герасимов, С.Г. Игнатов // *Здоровье населения и среда обитания.* – 2011, № 5. – С. 26-28.

14. **Фирстова, В.В.** Использование антигенов *F.tularensis* для выявления клеточного противотуляремийного иммунитета / **В.В. Фирстова**, В.М. Павлов, А.А. Горбатов, И.А. Дятлов // *Физиология и патология иммунной системы.* – 2013. – № 4. – С. 14-20.

#### **б) Руководство**

15. Руководство по вакцинопрофилактике особо опасных инфекций. Руководство; под ред. проф. И.В. Борисевича, проф. И.В. Дармова. – Киров: ООО «Кировская областная типография», 2011 – 152 с.

#### **в) Монография**

16. Микробиоценозы и здоровье человека; под ред. В.А. Алёшкина, С.С. Афанасьева, А.В. Караулова. – М.: «Медицина», 2010. – 209 с.

#### **г) тезисы докладов на научных конференциях**

17. Firstova, V.V. Evaluation of immunospecific protection against tularemia via flow cytofluorimeter technology / V.V. Firstova, A.L. Kravtsov, T.N. Schukovskaya, T.P. Schmelkova // *International School for Young Scientist and Students on Optics, Laser Physics and Biophysics.* September 21-24, 2004. – Saratov, Russia. – P. 45.

18. Зырина, Е.В. Выявление в системе *in vitro* специфической активации антигенами чумного микроба субпопуляций лимфоцитов (Т-хелперов и Т-супрессоров) мышей линии BALB/c, вакцинированных вакцинным штаммом *Yersinia pestis* EV НИИЭГ / Е.В. Зырина, **В.В. Фирстова**, Г.М. Титарева, И.В. Бахтева // *Материалы научно-практической конференции молодых ученых и специалистов научно-исследовательских учреждений Роспотребнадзора «Биологическая безопасность в современном мире», 21-22 апреля 2009, Оболенск.* – 2009. – С. 217-219.

19. **Фирстова, В.В.** Выявление противотуляреминого иммунитета по специфической активации Т-хелперов / **В.В. Фирстова**, Е.Ю. Зырина, В.М. Павлов, Е.А. Тюрин, М.В. Храмов // Сборник материалов XVII Российского национального конгресса «Человек и лекарство», 12-16 апреля, Москва. – 2010 г. – 286 с.

20. **Фирстова, В.В.** Оценка специфического иммунитета людей, регулярно вакцинирующихся по профилактическим показаниям против чумы / **В.В. Фирстова**, Т.Б. Кравченко, Е.В. Зырина, Е.А. Тюрин // Материалы Международной конференции «Развитие научных исследований и надзор за инфекционными заболеваниями», 18-20 мая 2010 г. – СПб. – С. 39.

21. **Firstova, V.V.** Evaluation of quantitative of activation molecules and IFN- $\gamma$  synthesis by T-helpers for use as an in vitro-based assay of cellular antiplague immunity / **V.V. Firstova**, E.A. Turin, T.B. Kravchenko, E.V. Zyrina, S.F. Biketov, I.A. Dyatloff // 10th International Symposium, October 23-27, 2010, Recife, Brasil. P064. – P. 80-90.

22. **Firstova, V.V.** Interferon-  $\gamma$  response of lymphocytes of BALB/c mice infected with *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis*, *Salmonells enteritidis* in reply to tularinum in vitro / **V.V. Firstova**, Т.В. Kravchenko, М.В. Pavlov, E.V. Zyrina, A.I. Borzilov, S.F. Biketov // 6-th International conferevce of emerging zoonoses, February 24-27, Cancun, Mexico, 2011.

23. **Firstova, V.V.** Markers of immunity correlated with protection against *Francisella tularensis* infection / **V.V. Firstova**, Т.И. Kombarova, A.N. Mokrievich, V.M. Pavlov, A.A. Gorbатов, E.V. Baranova, S.F. Biketov // Book of abstract of the first International Conference on Infection Diseases and Nanomedicine, 15-18 Dec., 2012, Kathmandu, Nepal. – 2012. – P. 21.

24. Горбатов, А.А. Применение антигенных препаратов *F. tularensis* для оценки специфического иммунитета людей, вакцинированных живой туляреминой вакциной / А.А. Горбатов, П.В. Соловьев, **В.В. Фирстова**, Е.В. Зырина, С.Ф. Бикетов // Российский иммунологический журнал. – 2013. – Т. 7 (16), № 2-3. – С. 246.

25. **Фирстова, В.В.** Особенности активации иммунокомпетентных клеток в ответ на иммунизация мышей V антигенами, выделенными из штаммов *Y. pestis* EV и *Y.pestis* I3455 / **В.В. Фирстова**, Е.Ю. Зырина, О.В. Калмантаева, П.Х. Копылов, Э.А. Светоч, Е.А. Панферцев, А.П. Анисимов // Российский иммунологический журнал. – 2013. –Т. 7 (16), № 2-3. – С. 257.

26. Estimation of humoral and cellular immune response of mice immunized with different doses of *F. tularensis* 15 NIEG // Book of abstracts of 15<sup>th</sup> International congress of immunology, 22-27 August, Italy, Milan. – 2013.

27. **Firstova, V.V.** Markers of immunity correlated with protection against *Francisella tularensis* infection / **V.V. Firstova**, A.N. Mokrievich, V.M. Pavlov, A.A. Gorbатов, E.V. Baranova, S.F. Biketov // Book of abstract of the first International Conference on Infection Diseases and Nanomedicine, Dec. 15-18, 2012, Kathmandu, Nepal. – 2012. – P. 21.

28. Gorbатов, A. Detection of specific antibodies to *Francisella tularensis* antigens to differentiates vaccine and infection process / A. Gorbатов, P. Solov'ev, **V. Firstova**, E. Baranova, E. Panfertsev, A. Mokrievich, N. Pavlovich, N. Aronova,



S. Biketov // International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance, 31 October, 2014, Austria, Vienna. – 2014. – P. 82.

29. **Фирстова, В.В.** Отечественная рекомбинантная холерная вакцина – разработка и доклинические испытания / **В.В. Фирстова**, Ю.Б. Резников, Т.Н. Щуковская, М.Ю. Ледванов, Е.Ю. Лоцманова // Аллергология и иммунология. – 2000. – Т. 1, № 3. – С. 86.

30. **Фирстова, В.В.** Использование модели RITARD для мониторинга инфекционного процесса при холере и оценки иммунологической эффективности оральных холерных вакцин / **В.В. Фирстова**, Е.Ю. Лоцманова, Т.Н. Щуковская, Н.В. Емельянова, А.Л. Кравцов // Природно-очаговые особо опасные инфекции на юге России, их профилактика и лабораторная диагностика: сб. науч. трудов, посвященный 100-летию Астраханской противочумной станции. – Астрахань: ГУП «Издательско-полиграфический комплекс «Волга», 2001. – С.253-256.

31. **Фирстова, В.В.** Оценка безопасности и иммуногенности холерных вакцинных препаратов по характеру перестройки генетического аппарата иммунокомпетентных клеток / **В.В. Фирстова**, А.Л. Кравцов, Т.Н. Щуковская, Е.Ю. Лоцманова, Н.В. Емельянова // «Холера и патогенные для человека вибрионы»: материалы проблемной комиссии межведомственного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации. – Ростов-на-Дону, 2001. – Вып. 14. – С. 95-97.

32. Shchukovskaya, T.N. Immunological and protective efficacy of *Vibrio cholerae* ghosts on rabbits model / T.N. Shchukovskaya, W. Lubitz, **V.V. Firstova**, E.Yu. Lotzmanova // Abstracts NAMBB 2001. – Vienna, 2001. – P. 28.

33. Лоцманова, Е.Ю. Оценка иммунологической эффективности оральных холерных вакцин при помощи метода RITARD / Е.Ю. Лоцманова, Т.Н. Щуковская, **В.В. Фирстова**, Н.В. Емельянова, А.Л. Кравцов // «Холера и патогенные для человека вибрионы»: материалы проблемной комиссии межведомственного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации. – Ростов-на-Дону, 2002. – Вып. 15. – С. 100-102.

34. Анисимова, Т.И. Государственные доклинические испытания *V. cholerae* eltor KM-184, предлагаемого в качестве вакцинного / Т.И. Анисимова, И.Г. Дроздов, Т.Н. Щуковская, **В.В. Фирстова**, Г.А. Ерошенко, Л.В. Саяпина, Л.С. Назарова // «Холера и патогенные для человека вибрионы»: материалы проблемной комиссии межведомственного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации. – Ростов-на-Дону, 2002. – Вып. 15. – С. 108-109.

35. **Firstova, V.V.** Changes in lysosomes, apoptosis and chromatin of white blood cells uring cholera infection and vaccination / **V.V. Firstova**, A.L. Kravtsov, T.N. Schukovskaya, E.Yu. Lotsmanova // Molecular basis of the immune response: Abstracts 6th John Humphrey Advanced summer programme in immunology, September 15-22, 2002, Pushchino. – 2002. – P. 29-30.