

DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-62-69

УДК 616.98:579.841.95

А.С. Карцева, О.В. Калмантаева, М.В. Силкина, Т.И. Комбарова, В.М. Павлов, А.Н. Мокриевич, В.В. Фирстова

ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУНОГЕННЫХ И ПРОТЕКТИВНЫХ СВОЙСТВ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ВАРИАНТОВ ШТАММА *FRANCISELLA TULARENSIS* 15 НИИЭГ

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», п. Оболенск, Российская Федерация

Francisella tularensis является внутриклеточной бактерией, вызывающей туляремию. Прогресс в создании безопасной и эффективной вакцины для профилактики туляремии затруднен из-за недостатка знаний об иммунологических параметрах, отражающих защитный адаптивный иммунитет. **Целью** исследований являлась оценка влияния модификаций генома *F. tularensis* 15 НИИЭГ на иммуногенные и протективные свойства штаммов *F. tularensis* 15/23-1ΔrecA и *F. tularensis* 15/23-1/sodBΔrecA. **Материалы и методы.** Многопараметрическая проточная цитометрия и измерение секретируемых цитокинов использованы для характеристики реакций лимфоцитов селезенки мышей на рестимуляцию кислотонерастворимым комплексом *F. tularensis* в системе *in vitro*, также проведен анализ титров специфических антител к липополисахариду *F. tularensis* в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа. **Результаты и обсуждение.** В работе показано, что иммунизация исследуемыми штаммами приводила к достоверному увеличению CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клеток, способных экспрессировать функциональные маркеры CD69, CD25 и/или CD28, а также к увеличению субпопуляции Т-хелперов, синтезирующих IFN-γ. В организме иммунных мышей формировался пул В-лимфоцитов, способных секретировать IFN-γ в ответ на их стимуляцию кислотонерастворимым комплексом. Иммунизация штаммом 15/23-1/sodBΔrecA обеспечивала 70 % защиту у мышей от интраназального заражения вирулентным штаммом *F. tularensis* SchuS4. Более выраженные протективные свойства связаны с активацией не только В-лимфоцитов и Т-хелперов, но также с одновременной активацией цитотоксических Т-лимфоцитов.

Ключевые слова: туляремия, вакцина, Т-лимфоциты, цитокины, В-лимфоциты, протективность.

Корреспондирующий автор: Карцева Алена Сергеевна, e-mail: kartseva_as@mail.ru.

Для цитирования: Карцева А.С., Калмантаева О.В., Силкина М.В., Комбарова Т.И., Павлов В.М., Мокриевич А.Н., Фирстова В.В. Характеристика иммуногенных и протективных свойств модифицированных вариантов штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ. Проблемы особо опасных инфекций. 2020; 3:62–69. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-62-69

Поступила 02.04.20. Отправлена на доработку 24.04.20. Принята к публ. 16.06.20.

A.S. Kartseva, O.V. Kalmantaeva, M.V. Silkina, T.I. Kombarova, V.M. Pavlov, A.N. Mokrievich, V.V. Firstova

Characterization of Immunogenic and Protective Properties of the Modified Variants of the Strain *Francisella tularensis* 15 NIEG

State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation

Abstract. *Francisella tularensis* is an intracellular bacterium that causes tularemia. Progress in creating a safe and effective vaccine for the prevention of tularemia is challenging due to a lack of knowledge about immunological parameters indicative of protective adaptive immunity. **Objective** of the research was to assess the effect of modifications of the *F. tularensis* 15 NIEG genome on the immunogenic and protective properties of *F. tularensis* 15/23-1ΔrecA and *F. tularensis* 15/23-1/sodBΔrecA strains. **Materials and methods.** Multi-parameter flow cytometry and the measurement of secreted cytokines were used to characterize the responses of mouse spleen lymphocytes in response to re-stimulation of *F. tularensis* with acid-insoluble complex (AIC) *in vitro*. Also, the titers of specific antibodies to *F. tularensis* lipopolysaccharide in blood serum were analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results and discussion.** It has been shown that immunization with the studied strains led to a significant increase in CD4⁺ and/or CD8⁺ T cells capable of expressing functional markers: CD69, CD25 and/or CD28; an increase in the subpopulation of T-helpers synthesizing IFN-γ. In the body of immune mice, a pool of B-lymphocytes was formed, capable of secreting IFN-γ in response to their stimulation with AIC. Immunization with the strain 15/23-1/sodBΔrecA provided 70% protection in mice from intranasal infection with a virulent strain of *F. tularensis* SchuS4. More pronounced protective properties were associated with the activation of not only B-lymphocytes and T-helpers, but also with the simultaneous activation of cytotoxic T-lymphocytes.

Key words: tularemia, vaccine, T-lymphocytes, cytokines, B-lymphocytes, protectivity.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Kartseva Alyena Sergeevna, e-mail: kartseva_as@mail.ru.

Citation: Kartseva A.S., Kalmantaeva O.V., Silkina M.V., Kombarova T.I., Pavlov V.M., Mokrievich A.N., Firstova V.V. Characterization of Immunogenic and Protective Properties of the Modified Variants of the Strain *Francisella tularensis* 15 NIEG. Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2020; 3:62–69. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-62-69

Received 02.04.20. Revised 24.04.20. Accepted 16.06.20.

Kartseva A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3159-6439>
Kalmantaeva O.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2838-6879>
Silkina M.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5329-2807>
Kombarova T.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1959-1739>
Pavlov V.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9107-5304>
Mokrievich A.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3675-8780>
Firstova V.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9898-9894>

Тюляремия – особо опасная инфекция, являющаяся природно-очаговым зоонозом. Этиологический агент этой инфекции – грамотрицательная коккобацилла *Francisella tularensis*. Вакцинопрофилактику туляремии на территории России проводят вакциной туляремиальной живой сухой, созданной на основе штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ [1]. Живая туляремиальная вакцина формирует длительный иммунитет против туляремии, но характеризуется умеренной реактогенностью и определенной генетической нестабильностью [2]. В связи с этим на основе *F. tularensis* 15 НИИЭГ сконструированы два новых штамма: *F. tularensis* 15/23-1ΔrecA [3] и *F. tularensis* 15/23-1/sodBΔrecA, у которых удалена одна копия гена *iglC* и делегирован ген *recA*. У штамма *F. tularensis* 15/23-1/sodBΔrecA дополнительно модифицирован ген *sodB* [4]. Удаление одной копии гена *iglC* из штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ и модификация гена *sodB* привели к снижению способности бактерий размножаться в макрофагах, а делеция гена *recA* стабилизировала геном за счет снижения вероятности гомологичной рекомбинации в клетках *F. tularensis* [2].

Целью наших исследований явилась оценка влияния модификаций генома *F. tularensis* 15 НИИЭГ на иммуногенные и протективные свойства штаммов *F. tularensis* 15/23-1ΔrecA и *F. tularensis* 15/23-1/sodBΔrecA.

Материалы и методы

Исследования проведены на базе ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии».

Бактериальные штаммы. Штаммы, использованные в работе, предоставлены Государственной коллекцией патогенных микроорганизмов и клеточных культур (ГКПМ-Оболensk) (таблица).

Бактериальные штаммы

Bacterial strains

Название Name	Характеристика Characteristics
<i>F. tularensis</i> 15 линии НИИЭГ <i>F. tularensis</i> 15 NIEG	subsp. <i>holarctica</i> , вакцинный штамм subsp. <i>holarctica</i> , vaccine strain
<i>F. tularensis</i> 15/23-1ΔrecA	<i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ с инактивированной одной из двух копий гена <i>iglC</i> и делегированным геном <i>recA</i> <i>F. tularensis</i> 15 NIEG with an inactivated <i>iglC</i> gene copy and deleted <i>recA</i> gene
<i>F. tularensis</i> 15/23-1/sodBΔrecA	<i>F. tularensis</i> 15/23-1ΔrecA с модифицированным геном <i>sodB</i> <i>F. tularensis</i> 15/23-1ΔrecA with modified <i>sodB</i> gene

Экспериментальные животные. Для проведения исследований использованы мыши линии BALB/c (питомник «Пушино», ФИБХ РАН, г. Пушино). Масса мышей составляла 18–20 г, возраст – 6–8 недель. Все стадии исследования соответствовали законодательству РФ, международным этическим нормам и нормативным документам учреждения.

Иммунизация. Мышей иммунизировали однократно, подкожно в дозе 10² КОЕ/мл штаммами *F. tularensis*. В качестве контроля выступала группа интактных мышей.

Оценка иммуногенной активности. На 30-е сутки после иммунизации проводили эвтаназию животных, получали кровь для выделения сыворотки и селезенку для выделения субпопуляции лимфоцитов на градиенте плотности Histopaque-1,077 (Sigma, США).

Антигены. Для специфической стимуляции использовали препараты: кислотонерастворимый комплекс (КНК) *F. tularensis* 15 НИИЭГ [5, 6] и липополисахарид (ЛПС) *F. tularensis*.

Определение антител в сыворотке крови к ЛПС *F. tularensis*. В сыворотке крови мышей определяли уровень титров антител IgG к ЛПС *F. tularensis* методом твердофазного иммуноферментного анализа с адсорбцией антигена по 10 мкг/мл в 96-луночных плоскодонных планшетах. Учет результатов проводили на приборе Thermo Scientific Varioskan Flash (Thermo Scientific, США) при длине волны 450 нм. В качестве отрицательного контроля выступала сыворотка интактных мышей.

Определение специфической активации лимфоцитов. Экспрессию поверхностных маркеров и синтез цитокинов оценивали на лимфоцитах, выделенных из селезенки, в системе *in vitro* после их рестимуляции КНК *F. tularensis* в концентрации 10 мкг/мл. Отрицательным контролем выступали клетки, инкубируемые в среде в отсутствие антигена. Лимфоциты инкубировали при температуре 37 °C, во влажной атмосфере, 5 % углекислого газа (CO₂). Анализ уровня экспрессии CD69 молекулы на поверхности лимфоцитов и содержания внутриклеточных цитокинов IFN-γ и IL-4 проводили через 24 ч после инкубации; экспрессию CD25 молекулы и уровень IFN-γ в клеточном супернатанте анализировали через 48 ч после инкубации.

Анализ субпопуляционного состава лимфоцитов. Субпопуляционный состав лимфоцитов определяли с использованием следующих комбинаций моноклональных антител: активированные цитотоксические Т-лимфоциты и Т-хелперы – CD3 FITC, CD4 APC, CD69 PE, CD25 PerCP-cy5.5, CD28

PerCP-cy5.5; активированные В-лимфоциты – CD19 APC, CD69 FITC, CD25 PerCP-cy5.5 (eBioscience, США). Анализ образцов проводили на проточном цитофлюориметре FACS Aria III (Becton Dickinson, США) с использованием программного обеспечения BD FACSDiva (версия 8.0). В каждом образце анализировали 10000 событий по гейту лимфоцитов.

Анализ продукции IFN- γ и IL-4 лимфоцитами. Уровень внутриклеточного содержания IFN- γ и IL-4 в субпопуляциях Т- и В-клеток определяли согласно руководству [2]. Далее лимфоциты окрашивали моноклональными антителами – CD3 FITC, CD8 APC, CD19 APC, IFN- γ PerCP-cy5.5 и IL-4 PE (eBioscience, США), после этого образцы фиксировали в 1 % растворе формалина и анализировали на проточном цитофлюориметре. Уровень цитокина IFN- γ в клеточном супернатанте определяли методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа согласно инструкции производителя (BD Biosciences, США).

Определение протективной активности штаммов. Для определения протективной активности штаммов через 30 дней после иммунизации мышам интраназально вводили тест-заражающий вирулентный штамм Schu *F. tularensis* в дозе $3 \cdot 10^3$ КОЕ/мл. В качестве контроля выступала группа интактных мышей. За животными наблюдали 21 день, оценивая их падеж.

Статистические методы. Систематизация исходной информации, визуализация полученных результатов и статистическая обработка осуществлялись при помощи программного обеспечения GraphPad Prism 6.00 for Windows (GraphPad Software Inc., США). Данные по титрам антител в сыворотке крови и цитокинам в клеточном супернатанте выражали при помощи среднеарифметического значения группы и его стандартного отклонения. Статистическое сравнение проводили с помощью непараметрического критерия Краскела – Уоллиса (при $p < 0,05$). Результаты цитометрических данных описывались в виде процента клеток от искомой субпопуляции и приводили как медиану и интерквартильный размах (Me (Q25:Q75)). Статистическое

сравнение данных между стимулированными КНК *F. tularensis* и нестимулированными клетками проводили с помощью непараметрического U-критерия Манна – Уитни (при $p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Уровень IgG-специфических антител в сыворотке крови. На 30-е сутки после иммунизации вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производными (штаммами 15/23-1 Δ recA или 15/23-1/sodB Δ recA) во всех группах животных появлялись IgG антитела к ЛПС *F. tularensis* (рис. 1). Сравнительный анализ показал, что значения титров антител IgG к ЛПС *F. tularensis* в сыворотке крови достоверно не различались ($p = 0,665$) между группами вакцинированных животных.

Анализ изменения экспрессии маркеров активации в субпопуляции В-лимфоцитов, стимулированных КНК in vitro. Иммунизация мышей штаммом 15 НИИЭГ приводила к активации В-лимфоцитов, о чем свидетельствовало достоверное увеличение уровня экспрессии CD69 и CD25 молекулы: процентное содержание В-клеток с фенотипом CD19⁺CD69⁺ увеличивалось при рестимуляции КНК *F. tularensis* по сравнению с нестимулированными клетками – 1,27 % (1,0; 2,27) и 15,70 % (12,05; 24,4) соответственно при $p = 0,007$; процентное содержание CD19⁺CD25⁺ клеток увеличивалось при рестимуляции КНК *F. tularensis* по сравнению с нестимулированными клетками этой же группы – 3,2 % (1,5; 4,75) и 21,4 % (13,50; 31,4) соответственно при $p = 0,007$. Данные представлены на рис. 2. В группе мышей, иммунизированных штаммом 15/23-1 Δ recA, также наблюдалось достоверное увеличение уровня экспрессии CD69 – с 1,2 % (0,35; 1,65) до 8,5 % (6,23; 13,75) при $p = 0,007$ и CD25 – с 3,1 % (2,30; 3,71) до 25,8 % (15,5; 33,25) при $p = 0,008$ молекул в системе *in vitro* после рестимуляции лимфоцитов КНК *F. tularensis*. В группе мышей, иммунизированных штаммом 15/23-1/sodB Δ recA, наблюдалось увеличение только субпопуляции CD19⁺CD25⁺ лимфоцитов – с 5,6 % (3,95; 12,98) до 23,6 % (17,95;

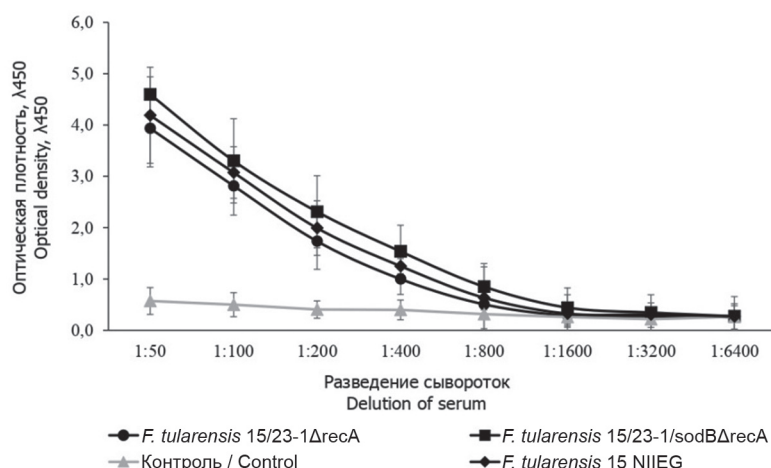


Рис. 1. Титры IgG антител к ЛПС *F. tularensis* в крови животных на 30-е сутки иммуногенеза

Примечания: результаты представлены в виде среднеарифметического значения группы и его стандартного отклонения. Для сравнения выборок использовался непараметрический критерий Краскела – Уоллиса.

Fig. 1. Titers of IgG antibodies to *F. tularensis* LPS in the blood of animals on the 30th day of immunogenesis

Note: The results are presented as the arithmetic mean of the group and its standard deviation. To compare the samples the non-parametric Kruskal – Wallis test was used.

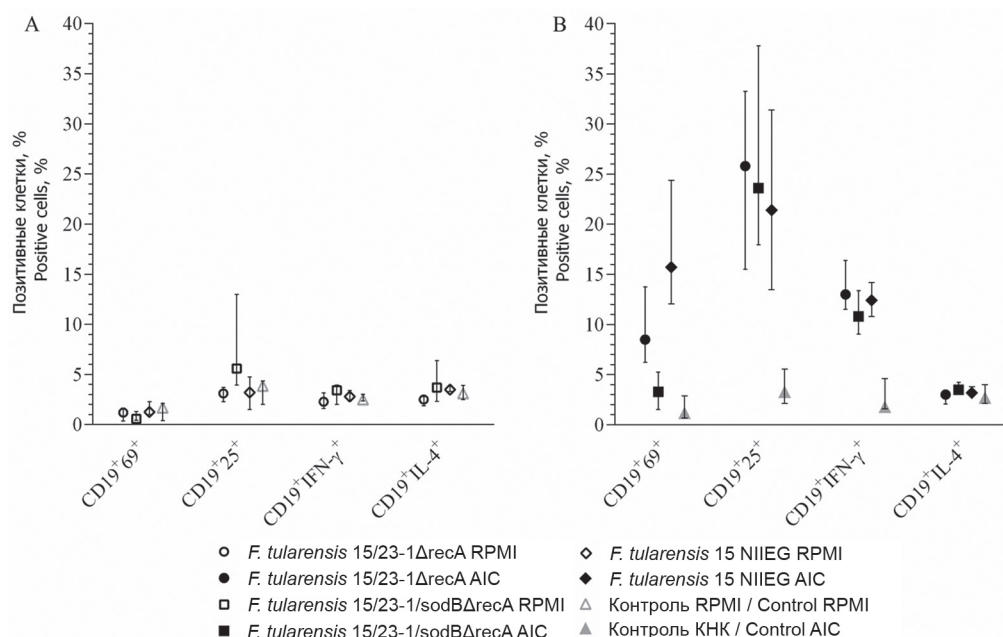


Рис. 2. Спонтанное (А) и индуцированное КНК *F. tularensis* (В) изменение процентного содержания активированных В-лимфоцитов мышей, иммунизированных штаммами *F. tularensis*

Примечания: незаштрихованный маркер – содержание клеток, инкубированных в среде (RPMI) в отсутствие антигена; заштрихованный маркер – содержание клеток, стимулированных *in vitro* КНК. Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха [Me (Q25:Q75)]. Для сравнения выборок использовался непараметрический критерий Манна – Уитни.

Fig. 2. Spontaneous (A) and induced by *F. tularensis* acid-insoluble complex (AIC) (B) change in the percentage of activated B-lymphocytes of mice immunized with *F. tularensis* strains

Notes: unshaded marker – the content of cells incubated in the medium (RPMI) in the absence of antigen; shaded marker – the content of cells stimulated *in vitro* by AIC. The results are presented as median and interquartile range [Me (Q25: Q75)]. Statistical analysis was performed using Mann – Whitney U test.

37,81) при $p=0,008$, достоверного увеличения CD69⁺ В-лимфоцитов после их рестимуляции *in vitro* не выявлено ($p=0,061$).

Сравнительный анализ уровня синтеза IFN-γ и IL-4 В-лимфоцитами, стимулированными КНК *in vitro*. В группе интактных мышей под влиянием КНК не происходило достоверного увеличения В-лимфоцитов, синтезирующих IFN-γ ($p=0,667$) или IL-4 ($p=0,595$) (рис. 2). Во всех группах иммунизированных мышей добавление КНК к полученным от животных В-лимфоцитам приводило к увеличению процентного содержания IFN-γ-синтезирующих клеток: после иммунизации штаммом 15 НИИЭГ увеличивалось с 2,8 % (2,35; 3,40) до 12,4 % (10,8; 14,20) при $p=0,007$; после иммунизации штаммом 15/23-1ΔrecA – с 2,28 % (1,60; 3,15) до 13,0 % (11,53; 16,40) при $p=0,007$; после иммунизации 15/23-1/sodBΔrecA – с 3,41 % (2,0; 3,95) до 10,8 % (9,05; 13,38) при $p=0,007$. Достоверного увеличения ($p>0,05$) процентного содержания клеток, синтезирующих IL-4, в группах иммунизированных животных после рестимуляции КНК *F. tularensis* не выявлено.

Анализ изменения экспрессии маркеров активации в субпопуляциях Т-лимфоцитов, стимулированных КНК *in vitro*. Стимуляция лимфоцитов КНК в системе *in vitro*, выделенных от мышей, иммунизированных штаммом 15 НИИЭГ и его производными: штаммами 15/23-1ΔrecA или 15/23-1/sodBΔrecA, приводила к активации Т-лимфоцитов

во всех группах иммунных животных (рис. 3). Анализ уровня экспрессии маркеров активации отдельных субпопуляций Т-лимфоцитов показал, что под влиянием КНК *in vitro* достоверно возрастало относительное содержание Т-хелперов с фенотипом CD3⁺CD4⁺CD69⁺ у всех иммунных мышей: у иммунизированных мышей штаммом 15 НИИЭГ с 1,56 % (1,11; 1,90) до 6,60 % (5,18; 9,95) при $p=0,007$; у иммунизированных мышей штаммом 15/23-1ΔrecA – с 0,80 % (0,52; 1,68) до 14,30 % (9,01; 19,77) при $p=0,008$; у иммунизированных мышей штаммом 15/23-1/sodBΔrecA – с 0,98 % (0,75; 2,36) до 9,80 % (5,78; 13,66) при $p=0,007$. Анализ субпопуляции цитотоксических Т-лимфоцитов показал, что под влиянием КНК *in vitro* происходило достоверное увеличение (с 0,98 % – 0,75; 2,36 до 9,80 % – 5,78; 13,66 при $p=0,008$) клеток с фенотипом CD3⁺CD8⁺CD69⁺ только у мышей, иммунизированных штаммом 15/23-1/sodBΔrecA.

Анализ изменения экспрессии ко-стимулирующей молекулы CD28 в субпопуляциях Т-лимфоцитов, стимулированных КНК *in vitro*. В ходе дальнейших исследований проведен анализ экспрессии корецептора CD28 на поверхности Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов (рис. 3). Выявлено, что под влиянием КНК, в сравнении с нестимулированными лимфоцитами этой же группы, достоверно ($p=0,016$) возрастало относительное содержание CD28⁺ Т-лимфоцитов с 20,40 % (17,75; 23,77) до

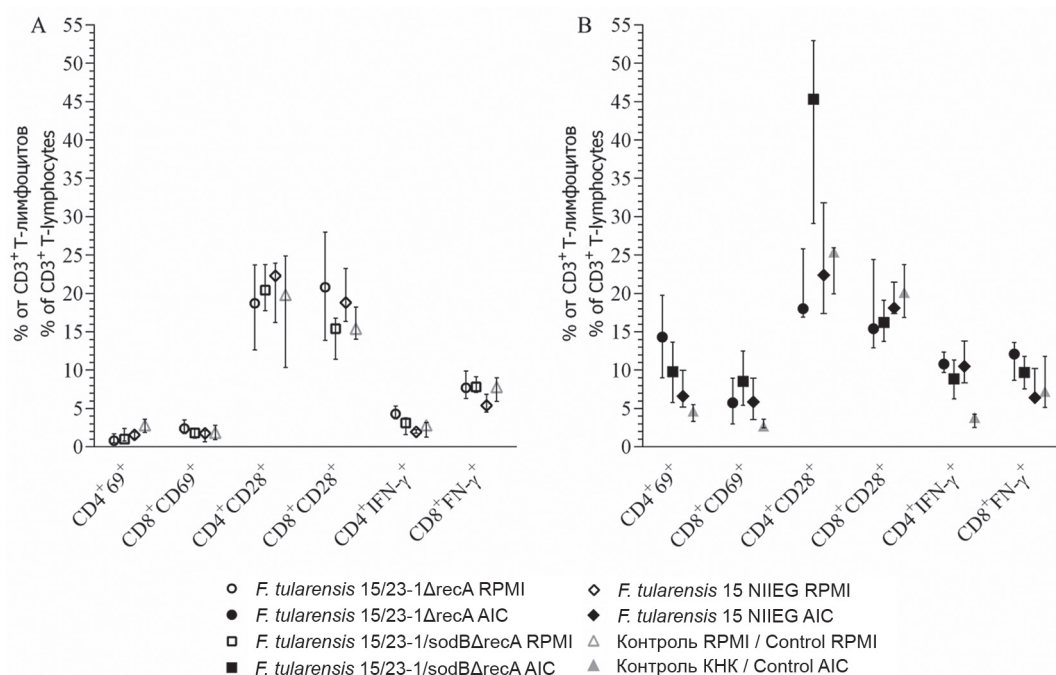


Рис. 3. Спонтанное (А) и индуцированное КНК *F. tularensis* (В) изменение процентного содержания активированных Т-лимфоцитов мышей, иммунизированных штаммами *F. tularensis*

Fig. 3. Spontaneous (A) and *F. tularensis* AIC induced (B) change in the percentage of activated T-lymphocytes of mice immunized with strains of *F. tularensis*

45,30 % (29,10; 52,95) только в группе животных, иммунизированных штаммом 15/23-1/sodBΔrecA. У мышей, иммунизированных штаммами 15 НИИЭГ или 15/23-1ΔrecA, после рестимуляции *in vitro* достоверно значимых различий ($p > 0,05$) уровня экспрессии CD28 молекулы на поверхности цитотоксических лимфоцитов или Т-хелперов не выявлено.

Сравнительный анализ уровня синтеза IFN-γ и IL-4 Т-лимфоцитами, стимулированными КНК *in vitro*. В экспериментах мы анализировали количество Т-лимфоцитов, способных синтезировать IFN-γ и IL-4, под влиянием КНК (рис. 3). Сравнительный анализ полученных данных показал, что во всех группах иммунных мышей наблюдалось достоверное увеличение синтеза IFN-γ Т-хелперами, но не цитотоксическими Т-лимфоцитами: у иммунизированных 15 НИИЭГ с 1,95 % (1,75; 2,25) до 10,50 % (8,35; 13,80) при $p = 0,008$; у иммунизированных 15/23-1ΔrecA – с 4,3 % (3,65; 5,29) до 10,80 % (9,70; 12,35) при $p = 0,007$; у иммунизированных 15/23-1/sodBΔrecA – с 3,10 % (1,57; 3,75) до 8,85 % (6,26; 11,30) при $p = 0,008$. Уровень секреции IL-4 Т-клетками не изменялся под влиянием антигенов и был сопоставим с уровнем синтеза IL-4 Т-лимфоцитами, полученными из группы интактных мышей (данные не приведены).

Сравнительный анализ уровня IFN-γ и IL-4 в супернатанте. В исследуемых группах мы анализировали продукцию цитокинов IFN-γ и IL-4 в клеточном супернатанте методом ИФА (рис. 4). Во всех группах иммунизированных животных подтвердилось увеличение синтеза IFN-γ через 48 ч после рестимуляции лимфоцитов КНК *F. tularensis* и отсутствие продукции IL-4.

Выживаемость. 70 % мышей, иммунизированных штаммом 15/23-1/sodBΔrecA, выживали после интраназального заражения бактериями *F. tularensis*

Schu в дозе 1000 DCL (рис. 5). Мыши, иммунизированные штаммами 15/23-1ΔrecA и 15 НИИЭГ, были защищены от интраназального заражения *F. tularensis* Schu в меньшей степени: уровень выживаемости животных составил 30 и 50 % соответственно. Все мыши интактной группы погибали к пятым суткам после заражения.

Разработка новой вакцины против туляремии является актуальным вопросом. Это связано с остаточной реактогенностью используемой в настоящее время живой туляремийной вакцины, генетической нестабильностью и низкой степенью защиты от аэрозольного заражения туляремией. Ранее нами показано, что делеция гена *recA* и одной копии гена *iglC* в геноме бактерий штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ приводит к снижению реактогенности [2].

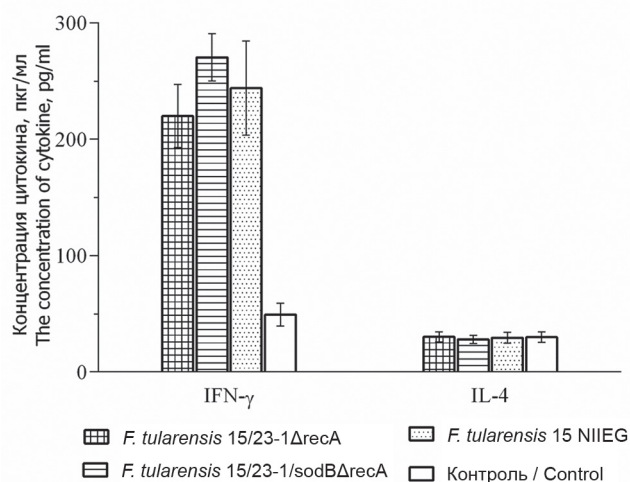


Рис. 4. Концентрация IFN-γ и IL-4 в клеточном супернатанте лимфоцитов после иммунизации штаммами *F. tularensis*

Fig. 4. The content of IFN-γ and IL-4 in the cell supernatant of lymphocytes after immunization with *F. tularensis* strains

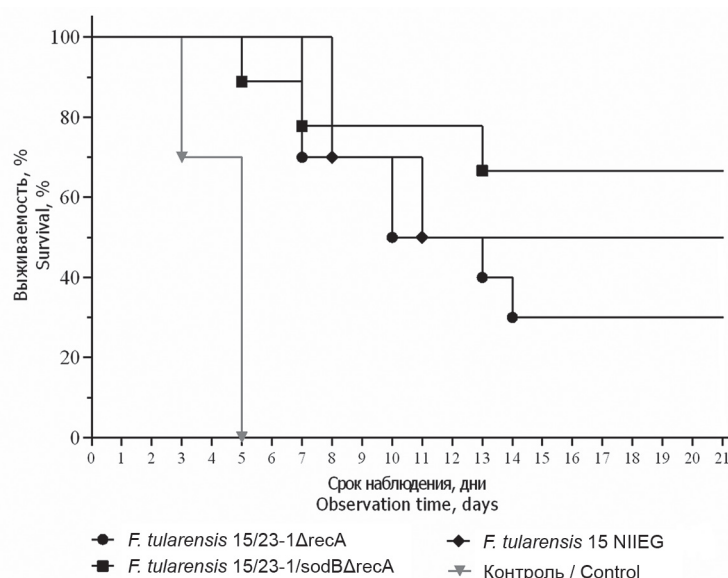


Рис. 5. Выживаемость иммунных мышей после интраназального заражения бактериями *F. tularensis* Schu в дозе 1000 DCL

Fig. 5. Survivability of immune mice after intranasal infection with bacteria *F. tularensis* Schu in a dose of 1000 DCL

В настоящих проведенных экспериментах показано, что генетические модификации туляреминого вакцинного штамма оказали влияние на уровень протективности против поствакцинального интраназального заражения вирулентным штаммом Schu *F. tularensis* subsp. *tularensis*. Выживаемость иммунных животных после заражения являлась максимально высокой в группе животных, иммунизированных 15/23-1/sodBΔrecA (70 %), по сравнению с животными, иммунизированными *F. tularensis* 15 НИИЭГ (50 %) или 15/23-1ΔrecA (30 %).

Сравнительный анализ уровня специфических антител в крови животных на 30-е сутки после иммунизации разными штаммами показал, что титры антител к ЛПС *F. tularensis* достоверно не различались между группами иммунных мышей и колебались в пределах 1:400÷1:800. Известно, что антитела к антигенам *F. tularensis* играют вспомогательную роль в борьбе с инфекцией, усиливая Т-клеточный ответ посредством опсонизации бактерий [7]. В связи с тем, что большая часть жизнедеятельности бактерий (включая репликацию) проходит внутриклеточно, уровень антител не коррелирует с протективностью противотуляреминого иммунитета. Поэтому мы попытались выявить особенности специфических клеточных реакций иммунокомпетентных клеток у мышей, иммунизированных разными штаммами.

Хотя для возбудителей внутриклеточных инфекций ведущая роль принадлежит Т-клеточному звену иммунитета, эксперименты, проведенные с knock-out мышами с использованием вирулентного штамма *F. tularensis* SchuS4, показали, что выживаемость мышей при туляреминой инфекции коррелировала с участием не только Т-лимфоцитов ($\alpha\beta\text{TCR}^+$ и $\gamma\delta\text{TCR}^+$), но и В-лимфоцитов [8].

В-лимфоциты способны регулировать специфические иммунные реакции с помощью дополнительных, независимых от антител механизмов [9–11]. В наших экспериментах *in vitro* выявлено, что под влиянием КНК В-лимфоциты всех групп иммунных

животных стремительно активировались, о чем свидетельствовало увеличение пула клеток, экспрессирующих CD69 рецептор, активирующий эффекторную функцию лимфоцитов [12], и CD25 молекулу – лиганд IL-2, который при связывании усиливает пролиферативную активность клетки [13].

Формирование протективных противотуляреминых реакций зависит от наличия В-лимфоцитов, способных синтезировать IFN- γ , на ранних этапах иммунного ответа [14]. При этом необходимость участия В-лимфоцитов в формировании иммунного ответа зависит от уровня вирулентности штамма *Francisella*: чем выше вирулентность, тем более востребовано проявление эффекторной функции В-лимфоцитами [15, 16]. В ходе собственных экспериментов нами показано, что во всех группах иммунных мышей под влиянием КНК отмечалось увеличение В-лимфоцитов, синтезирующих IFN- γ , но не IL-4. Таким образом, у всех иммунных мышей уровни вовлеченности В-лимфоцитов в формирование противотуляреминого иммунитета не различались между собой.

Т-клетки играют ключевую роль в адаптивной иммунной системе, опосредуя клеточный иммунитет и организуя иммунный ответ в целом [17, 18]. Для полной активации наивных Т-лимфоцитов и инициации ответов CD4⁺ клеток памяти необходимо не только распознавание антигена через TCR-рецептор, но и дополнительная ко-стимуляция через рецептор CD28 через связывание с его лигандами CD86 или CD80, экспрессируемыми на поверхности антигенпрезентирующих клеток. Связывание CD28 с его лигандами (CD80/CD86) запускает транскрипционную программу, которая обеспечивает эффективную пролиферацию и дифференцировку Т-клеток. В предыдущем исследовании мы показали, что уже на третьи сутки у мышей после иммунизации аттенуированными штаммами *F. tularensis* наблюдается повышение уровня CD28 молекулы, что отражает усиление межклеточных взаимодействий и совпада-

ет с увеличением экспрессии CD86 на поверхности В-клеток [19]. Сравнительный анализ полученных в этой работе результатов показал, что только в группе мышей, иммунизированных штаммом 15/23-1/sodBΔrecA, выявлено достоверное увеличение под влиянием КНК Т-хелперов, экспрессирующих ко-стимулирующую молекулу CD28.

При туляреминой инфекции важна роль Т-хелперов и цитотоксических лимфоцитов – исключение одной из этих субпопуляций Т-лимфоцитов приводит к гибели иммунных мышей [20]. Выявлено, что только в группе мышей, иммунизированных штаммом 15/23-1/sodBΔrecA, увеличивалось количество активированных (CD69⁺) цитотоксических Т-лимфоцитов в ответ на рестимуляцию антигенами *F. tularensis*.

В ответ на рестимуляцию КНК Т-лимфоциты, полученные от всех групп иммунных мышей, синтезировали IFN-γ преимущественно за счет субпопуляции Т-хелперов. Количество синтезирующих IFN-γ Т-хелперов достоверно не различалось между группами, но общее содержание IFN-γ в супернатанте культуры клеток, стимулированных КНК, было выше в группе мышей, иммунизированных штаммом 15/23-1/sodBΔrecA. Это позволяет говорить о более активном синтезе IFN-γ другими иммунокомпетентными клетками.

Суммируя полученные результаты экспериментов, можно заключить, что более выраженный уровень защиты от интраназального заражения вирулентным штаммом *F. tularensis* SchuS4 у мышей, иммунизированных 15/23-1/sodBΔrecA, по сравнению с остальными двумя штаммами может быть связан с выраженной активацией не только В-лимфоцитов и Т-хелперов, но и с одновременной активацией цитотоксических лимфоцитов.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Список литературы

- Олсуфьев Н.Г. Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии. М.: Медицина; 1975. 192 с.
- Дятлов И.А., редактор. Туляремия: состояние проблемы и методы исследования. М.: Династия; 2019. 263 с.
- Мокриевич А.Н., Вахрамеева Г.М., Титарева Г.М., Бахтеева И.В., Миронова Р.И., Комбарова Т.И., Кравченко Т.Б., Дятлов И.А., Павлов В.М. Получение и иммунобиологические свойства вакцинного штамма туляреминого микроба без одной копии гена *iglC* и без гена *recA*. *Молекулярная генетика, микробиология, вирусология*. 2015; 33(3):33–9.
- Сухова М.А., Вахрамеева Г.М., Кравченко Т.Б., Мокриевич А.Н., Павлов В.М., Дятлов И.А. Конструирование и изучение свойств вариантов штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ со сниженной экспрессией гена *sodB*, кодирующего Fe-супероксиддисмутазу. *Биотехнология*. 2015; 31(4):16–27.
- Волох О.А., Кузнецова Е.М., Смолькова Е.А., Щуковская Т.Н., Бугоркова С.А., Авдеева Н.Г., Филимонова Д.Г., Шмелькова Т.П., Ключева С.Н., Никифоров А.К. Экспериментальный препарат для специфической профилактики туляремии. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2013; 2:73–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-2-73-77.
- Сомов А.Н., Кравченко Т.Б., Павлов В.М., Вахрамеева Г.М., Комбарова Т.И., Миронова Р.И., Фирстова В.В., Калмантаева О.В., Ветчинин С.С., Мокриевич А.Н. Антигенные и иммуногенные свойства кислотонерастворимого комплекса *Francisella*

tularensis штамма 15 НИИЭГ в растворимой, адсорбированной и микрокапсулированной формах. *Биотехнология*. 2017; 33(5):23–34. DOI: 10.21519/0234-2758-2017-33-5-23-34.

7. Roberts L.M., Powell D.A., Frelinger J.A. Adaptive immunity to *Francisella tularensis* and considerations for vaccine development. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2018; 8:115. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00115.

8. Crane D.D., Scott D.P., Bosio C.M. Generation of a convalescent model of virulent *Francisella tularensis* infection for assessment of host requirements for survival of tularemia. *PLoS One*. 2012; 7:e33349. DOI: 10.1371/journal.pone.0033349.

9. Hurdal R., Ndlovu H.H., Revaz-Breton M., Parihar S.P., Nono J.K., Govender M., Brombacher F. IL-4-producing B cells regulate T helper cell dichotomy in type 1- and type 2-controlled diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017; 114(40):E8430–E8439. DOI: 10.1073/pnas.1708125114.

10. Wojciechowski W., Harris D.P., Sprague F., Mousseau B., Makris M., Kusser K., Honjo T., Mohrs K., Mohrs M., Randall T., Lund F.E. Cytokine-producing effector B cells regulate type 2 immunity to *H. polygyrus*. *Immunity*. 2009; 30(3):421–33. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.01.006.

11. Elkins K.L., Bosio C.M., Rhinehart-Jones T.R. Importance of B cells, but not specific antibodies, in primary and secondary protective immunity to the intracellular bacterium *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Infect. Immun.* 1999; 67(11):6002–7. DOI: 10.1128/IAI.67.11.6002-6007.1999.

12. Vega-Ramos J., Alari-Pahissa E., Valle J.D., Carrasco-Marín E., Esplugues E., Borrás M., Martínez-A. C., Lauzurica P. CD69 limits early inflammatory diseases associated with immune response to *Listeria monocytogenes* infection. *Immunol. Cell Biol.* 2010; 88(7):707–15. DOI: 10.1038/icc.2010.62.

13. Amu S., Gjerdtsson I., Brissler M. Functional characterization of murine CD25 expressing B cells. *Scand. J. Immunol.* 2010; 71(4):275–82. DOI: 10.1111/j.1365-3083.2010.02380.x.

14. Culkin S.J., Rhinehart-Jones T., Elkins K.L. A novel role for B cells in early protective immunity to an intracellular pathogen, *Francisella tularensis* strain LVS. *J. Immunol.* 1997; 158(7):3277–84. PMID: 9120284.

15. Elkins K.L., Cowley S.C., Bosio C.M. Innate and adaptive immunity to *Francisella*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2007; 1105:284–324. DOI: 10.1196/annals.1409.014.

16. Cowley S.C., Elkins K.L. Immunity to *Francisella*. *Front. Microbiol.* 2011; 2:26. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00026.

17. Elkins K.L., Kurtz S.L., De Pascalis R. Progress, challenges, and opportunities in *Francisella* vaccine development. *Expert Rev. Vaccines*. 2016; 15(9):1183–96. DOI: 10.1586/14760584.2016.1170601.

18. Beyersdorf N., Kerkau T., Hünig T. CD28 co-stimulation in T-cell homeostasis: a recent perspective. *Immunotargets Ther.* 2015; 4:111–22. DOI: 10.2147/ITT.S61647.

19. Карцева А.С., Силкина М.В., Калмантаева О.В., Миронова Р.И., Фирстова В.В., Павлов В.М., Шемякин И.Г. Сравнение раннего иммунного ответа мышей, иммунизированных туляреминым вакцинным штаммом и его производными. *Российский иммунологический журнал*. 2019; 22(3):1177–82.

20. Roberts L.M., Crane D.D., Wehrly T.D., Fletcher J.R., Jones B.D., Bosio C.M. Inclusion of epitopes that expand high-avidity CD4⁺ T cells transforms subprotective vaccines to efficacious immunogens against virulent *Francisella tularensis*. *J. Immunol.* 2016; 197(7):2738–47. DOI: 10.4049/jimmunol.1600879.

References

- Olsuf'ev N.G. [Taxonomy, Microbiology, and Laboratory Diagnostics of Tularemia Agent]. Moscow: "Meditsina"; 1975. 192 p.
- Dyatlov I.A., editor. [Tularemia: status of the issue and methods of study]. Moscow: "Dinastiya"; 2019. 263 p.
- Mokrievich A.N., Vakhrameeva G.M., Titareva G.M., Bakhteeva I.V., Mironova R.I., Kombarova T.I., Kravchenko T.B., Dyatlov I.A., Pavlov V.M. [Production and immunobiological properties of the vaccine strain of tularemia microbe without one copy of *iglC* gene and *recA* gene]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology, and Virology]* 2015; 33(3):33–9.
- Sukhova M.A., Vakhrameeva G.M., Kravchenko T.B., Mokrievich A.N., Pavlov V.M., Dyatlov I.A. [Constructing and studies of properties of *Francisella tularensis* 15 NIIEG strain variants with attenuated expression of *sodB* gene encoding Fe-superoxidismutase]. *Biotechnologiya [Biotechnology]*. 2015; 31(4):16–27.
- Volokh O.A., Kuznetsova E.M., Smol'kova E.A., Shchukovskaya T.N., Bugorkova S.A., Avdeeva N.G., Filimonova D.G., Shmel'kova T.P., Klyueva S.N., Nikiforov A.K. [Experimental preparation for specific prophylaxis of tularemia]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2013; 2:73–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-2-73-77.

6. Somov A.N., Kravchenko T.B., Pavlov V.M., Vakhrameeva G.M., Kombarova T.I., Mironova R.I., Firstova V.V., Kalmantaeva O.V., Vetchinin S.S., Mokrievich A.N. [Antigen and immunogenic properties of acid-insoluble complex of *Francisella tularensis* 15 NIEG in soluble, adsorbed, and micro-capsular entities]. *Biotechnologiya [Biotechnology]*. 2017; 33(5):23–34. DOI: 10.21519/0234-2758-2017-33-5-23-34.
7. Roberts L.M., Powell D.A., Frelinger J.A. Adaptive immunity to *Francisella tularensis* and considerations for vaccine development. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2018; 8:115. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00115.
8. Crane D.D., Scott D.P., Bosio C.M. Generation of a convalescent model of virulent *Francisella tularensis* infection for assessment of host requirements for survival of tularemia. *PLoS One*. 2012; 7:e33349. DOI: 10.1371/journal.pone.0033349.
9. Hurdal R., Ndlovu H.H., Revaz-Breton M., Parihar S.P., Nono J.K., Govender M., Brombacher F. IL-4-producing B cells regulate T helper cell dichotomy in type 1- and type 2-controlled diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017; 114(40):E8430–E8439. DOI: 10.1073/pnas.1708125114.
10. Wojciechowski W., Harris D.P., Sprague F., Mousseau B., Makris M., Kusser K., Honjo T., Mohrs K., Mohrs M., Randall T., Lund F.E. Cytokine-producing effector B cells regulate type 2 immunity to *H. polygyrus*. *Immunity*. 2009; 30(3):421–33. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.01.006.
11. Elkins K.L., Bosio C.M., Rhinehart-Jones T.R. Importance of B cells, but not specific antibodies, in primary and secondary protective immunity to the intracellular bacterium *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Infect. Immun.* 1999; 67(11):6002–7. DOI: 10.1128/IAI.67.11.6002-6007.1999.
12. Vega-Ramos J., Alari-Pahissa E., Valle J.D., Carrasco-Marin E., Esplugues E., Borràs M., Martínez-A C., Lauzurica P. CD69 limits early inflammatory diseases associated with immune response to *Listeria monocytogenes* infection. *Immunol. Cell Biol.* 2010; 88(7):707–15. DOI: 10.1038/icb.2010.62.
13. Amu S., Gjertsson I., Brisslert M. Functional characterization of murine CD25 expressing B cells. *Scand. J. Immunol.* 2010; 71(4):275–82. DOI: 10.1111/j.1365-3083.2010.02380.x.
14. Culkin S.J., Rhinehart-Jones T., Elkins K.L. A novel role for B cells in early protective immunity to an intracellular pathogen, *Francisella tularensis* strain LVS. *J. Immunol.* 1997; 158(7):3277–84. PMID: 9120284.
15. Elkins K.L., Cowley S.C., Bosio C.M. Innate and adaptive immunity to *Francisella*. *Ann. N Y Acad. Sci.* 2007; 1105:284–324. DOI: 10.1196/annals.1409.014.
16. Cowley S.C., Elkins K.L. Immunity to *Francisella*. *Front. Microbiol.* 2011; 2:26. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00026.
17. Elkins K.L., Kurtz S.L., De Pascalis R. Progress, challenges, and opportunities in *Francisella* vaccine development. *Expert Rev. Vaccines*. 2016; 15(9):1183–96. DOI: 10.1586/14760584.2016.1170601.
18. Beyersdorf N., Kerkau T., Hünig T. CD28 co-stimulation in T-cell homeostasis: a recent perspective. *Immunotargets Ther.* 2015; 4:111–22. DOI: 10.2147/ITT.S61647.
19. Kartseva A.S., Silkina M.V., Kalmantaeva O.V., Mironova R.I., Firstova V.V., Pavlov V.M., Shemyakin I.G. [Comparison of early immune response of mice vaccinated with tularemia vaccine strain and its derivatives]. *Rossiiskiy Immunologicheskyy Zhurnal [Russian Immunological Journal]*. 2019; 22(3):1177–82.
20. Roberts L.M., Crane D.D., Wehrly T.D., Fletcher J.R., Jones B.D., Bosio C.M. Inclusion of epitopes that expand high-avidity CD4⁺ T cells transforms subprotective vaccines to efficacious immunogens against virulent *Francisella tularensis*. *J. Immunol.* 2016; 197(7):2738–47. DOI: 10.4049/jimmunol.1600879.

Authors:

Kartseva A.S., Kalmantaeva O.V., Silkina M.V., Kombarova T.I., Pavlov V.M., Mokrievich A.N., Firstova V.V. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, 142279, Russian Federation. E-mail: info@obolensk.org.

Об авторах:

Карцева А.С., Калмантаева О.В., Силкина М.В., Комбарова Т.И., Павлов В.М., Мокриевич А.Н., Фирстова В.В. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Российская Федерация, 142279, Московская обл., п. Оболенск. E-mail: info@obolensk.org.