

DOI: 10.21055/0370-1069-2024-3-15-24

УДК 616.98:579.841.95

А.С. Карцева¹, М.В. Силкина¹, Т.А. Иващенко¹, Я.О. Романенко¹, Л.В. Саяпина², В.В. Фирстова¹**Выявление иммунологических коррелятов протекции при формировании специфического иммунитета к *Francisella tularensis***¹ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», п. Оболensk, Российская Федерация;²ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Российская Федерация

Живая туляремиальная вакцина является одной из самых эффективных бактериальных вакцин, при этом обладает высокой остаточной вирулентностью для лабораторных животных, что коррелирует с ее высокой реактогенностью при иммунизации людей с иммунодефицитным состоянием. Прогресс в создании безопасной и эффективной вакцины для профилактики туляремии затруднен из-за недостатка знаний о коррелятах протекции. **Цель** работы – анализ литературы, посвященной изучению ключевых моментов формирования поствакцинального иммунного ответа на введение живых туляремиальных вакцин и рекомбинантных штаммов – кандидатов в вакцинные, а также определение иммунологических коррелятов протекции при формировании специфического иммунитета к *Francisella tularensis*. В обзоре рассматриваются основные аспекты формирования врожденного и адаптивного иммунных ответов на введение живых туляремиальных вакцин на основе аттенуированных штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *F. tularensis* LVS у людей и при экспериментальной туляремиальной инфекции на мышинной модели. Изучение механизмов адаптивного иммунитета и выявление иммунологических коррелятов протекции при экспериментальной туляремии на мышинной модели является важным этапом в исследованиях по разработке новых вакцинных штаммов и совершенствованию лабораторных методов оценки Т-клеточного звена иммунитета. Основное внимание сосредоточено на изучении клеточных механизмов, лежащих в основе формирования протективного иммунитета при экспериментальной туляремии, определении иммунологических критериев его оценки и роли выявленных показателей в долгосрочной защите после окончания активной фазы иммунного ответа, индуцированного иммунизацией вакцинными препаратами на основе аттенуированных штаммов *F. tularensis*. Обсуждается влияние вакцинации на дифференцировку, функциональную активность и длительность циркулирования специфических центральных и эффекторных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток памяти у людей и мышей.

Ключевые слова: туляремия, штаммы – кандидаты в вакцинные, иммунологические корреляты, Т-клетки памяти, критерии оценки иммунного ответа.

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

Для цитирования: Карцева А.С., Силкина М.В., Иващенко Т.А., Романенко Я.О., Саяпина Л.В., Фирстова В.В. Выявление иммунологических коррелятов протекции при формировании специфического иммунитета к *Francisella tularensis*. Проблемы особо опасных инфекций. 2024; 3:15–24. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-3-15-24

Поступила 09.02.2024. Отправлена на доработку 01.03.2024. Принята к публ. 22.03.2024.

A.S. Kartseva¹, M.V. Silkina¹, T.A. Ivashchenko¹, Ya.O. Romanenko¹, L.V. Sayapina², V.V. Firstova¹**Identification of Immunological Correlates of Protection during Development of Specific Immunity to *Francisella tularensis***¹State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;²Scientific Center on Expertise of Medical Application Products, Moscow, Russian Federation

Abstract. Live tularemia vaccine is one of the most effective bacterial vaccines. However, it also has high residual virulence for laboratory animals and may cause adverse reactions in individuals with compromised immune systems. The development of a safe and effective tularemia vaccine is impeded by insufficient understanding of the protection correlates. **The aim** of this work is to review the literature on the development of post-vaccinal immune responses to live tularemia vaccines and recombinant vaccine candidate strains and to determine the immunological correlates of protection in the formation of specific immunity to *Francisella tularensis*. This review describes the main aspects of the development of innate and adaptive immune responses to the administration of live tularemia vaccines based on attenuated strains of *F. tularensis* 15 NIEG and *F. tularensis* LVS in humans and in experimental tularemia infection in a mouse model. Studying the mechanisms of adaptive immunity and identifying immunological correlates of protection in experimental tularemia in a murine model is crucial for researching new vaccine strains and improving laboratory methods for assessing the T-cell component of immunity. The main focus is on the study of cellular mechanisms underlying the formation of protective immunity in experimental tularemia, the determination of immunological criteria for its evaluation and the role of identified indicators in long-term protection after the end of the active phase of the immune response induced by immunization with vaccines based on attenuated *F. tularensis* strains. We discuss the effects of vaccination on the differentiation, functional activity, and duration of specific central and effector CD4⁺ and CD8⁺ memory T-cells circulation in humans and mice.

Key words: tularemia, vaccine candidate strains, immunological correlates, memory T-cells, immune response evaluation criteria.

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

Funding: The work was carried out within the framework of the industry program of the Rospotrebnadzor for 2021–2025 “Study of immunopathogenesis mechanisms in agents of infectious diseases”.

Corresponding author: Alena S. Kartseva, e-mail: kartseva_as@mail.ru.

Citation: Kartseva A.S., Silkina M.V., Ivashchenko T.A., Romanenko Ya.O., Sayapina L.V., Firstova V.V. Identification of Immunological Correlates of Protection during Development of Specific Immunity to *Francisella tularensis*. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2024; 3:15–24. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2024-3-15-24

Received 09.02.2024. **Revised** 01.03.2024. **Accepted** 22.03.2024.

Kartseva A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3159-6439>

Silkina M.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5329-2807>

Ivashchenko T.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4908-2524>

Romanenko Ya.O., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1698-6516>

Sayapina L.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2272-2621>

Firstova V.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9898-9894>

Повышенное внимание к туляремии в России определено существованием на ее территории большого количества природных очагов. Несмотря на проведение вакцинопрофилактики, в эндемичных районах ежегодно регистрируются спорадические случаи (реже эпидемические вспышки) туляремии среди населения [1].

В настоящее время эффективную защиту против туляремии обеспечивают живые вакцины, полученные на основе аттенуированных штаммов *Francisella tularensis*. В Российской Федерации используется зарегистрированная живая туляремиальная вакцина на основе штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ [2]. В США для производства экспериментальной вакцины используют штамм *F. tularensis* LVS [3]. Туляремиальная живая вакцина при введении индуцирует у привитых формирование напряженного противотуляремиального иммунитета [2].

Вакцины, полученные на основе живых штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *F. tularensis* LVS, были разработаны эмпирически, с ограниченным пониманием механизмов формирования и поддержания эффективного противотуляремиального ответа, а также при отсутствии высокочувствительных иммунологических методов, позволяющих в полной мере оценить развитие протективного иммунитета на уровне взаимодействия клеток иммунной системы. Вместе с тем недостаточно изученный механизм аттенуации штаммов и относительно высокая реактогенность вакцины, в том числе для людей с иммунодефицитом, является актуальной задачей создания безопасной живой туляремиальной вакцины [3].

В настоящее время успешно разрабатываются экспериментальные штаммы туляремиального микроба, кандидаты в вакцины [3]. Для изучения новых штаммов основным условием является использование объективных иммунологических методов и критериев оценки, позволяющих всесторонне оценить развитие специфического иммунного ответа при их введении [4–7]. Вышеизложенные подходы особенно важно учитывать при разработке дизайна доклинических и клинических исследований иммунологической эффективности вакцинных препаратов.

В представленном обзоре приведен анализ литературных источников по основным аспектам формирования иммунного ответа на введение живых туляремиальных вакцин и рекомбинантных штам-

мов – кандидатов в вакцинные, а также современным представлениям о корреляции между иммунологическими показателями и защитой организма от туляремиальной инфекции.

Врожденный иммунный ответ. В состав клеточной стенки туляремиального микроба, как и любой грамотрицательной бактерии, в качестве доминирующего компонента входит липополисахарид (ЛПС), имеющий ряд структурных особенностей, препятствующих активации иммунных реакций врожденного иммунитета [8, 9]. Как правило, распознавание TLR4/MD2-рецепторами ЛПС грамотрицательных бактерий индуцирует синтез провоспалительных цитокинов. Однако установлено, что очищенный ЛПС *F. tularensis* обладает слабой биологической активностью, возможно, обусловленной отсутствием фосфатных фрагментов структурных свойств фрагмента липида А, а также числом и длиной заместителей ацильной цепи [9].

Вместе с тем другими исследователями показано, что с TLR4-рецептором могут связываться и другие компоненты *F. tularensis*. В работе A.R. Ashtekar *et al.* продемонстрировано, что рекомбинантный белок теплового шока DnaK индуцирует через TLR4 созревание дендритных клеток, выделенных из костного мозга мышей, посредством активации костимулирующих молекул (CD40, CD80 и CD86) и продукции цитокинов IL-6, TNF- α , IL-12 p40 и IL-10 [10].

В течение первого десятилетия XXI в. появились сообщения о том, что TLR2-рецептор участвует в распознавании *F. tularensis*. Показано, что у мышей линии C57BL/6, нокаутных по TLR2-гену, по сравнению с мышами дикого типа при интраназальном введении сублетальной дозы штамма *F. tularensis* LVS наблюдается высокая бактериальная нагрузка, меньшая выживаемость животных и низкий уровень синтеза цитокинов IL-6 и TNF- α [11]. Результаты дальнейших исследований подтверждают важную роль TLR2-рецептора в активации антигенпрезентирующей функции мышиных макрофагов и дендритных клеток и контроле транскрипции генов провоспалительных цитокинов [9].

Установлено, что на ранних фазах взаимодействия *F. tularensis* с клетками врожденной иммунной системы важную роль играет присутствие белков опсопинов, предопределяющих внутриклеточную локализацию бактерий. Участие опсонофагоцитар-

ных рецепторов влияет на перемещение бактерий *F. tularensis* путем модуляции фагоцитарных путей, которые ограничивают выход бактерий из фагосомы и их внутриклеточное размножение. При этом поверхностные рецепторы маннозы, один из рецепторов лектина С-типа, рецепторы комплемента CR3 (CD11b/CD18) макрофагов, CR4 (CD11c/CD18) дендритных клеток, CR1/2 В-клеток и Fcγ-рецепторы участвуют в проникновении *F. tularensis* в клетку-хозяина [8, 9].

Проведенные экспериментальные работы Н. Geier *et al.* показали, что опсонизация сывороткой, содержащей антитела к *F. tularensis* SchuS4, переориентирует взаимодействие бактерий с макрофагами с рецептора маннозы на рецептор комплемента CR3, с рецептора-мусорщика А на FcγR-рецептор [12]. В свою очередь, CR3-опосредованный фагоцитоз *F. tularensis* снижает выход туляремиальных бактерий из фагосомы, а Fcγ-опосредованный фагоцитоз приводит к интенсивной продукции супероксида в ранней фагосоме, NADPH-оксидаз-зависимому окислительному взрыву и ограниченному выходу бактерий из фагосомы [13].

Таким образом, внедрение *F. tularensis* в клетки макроорганизма может осуществляться путем поглощения неопсонизированных либо опсонизированных бактерий. Достаточно сложная активация нескольких сигнальных путей влияет на результат взаимодействия бактерий *F. tularensis* и клеток врожденной иммунной системы.

По результатам изучения влияния *F. tularensis* на макрофаги и дендритные клетки установлено, что туляремиальный микроб находится внутри фагосомы, образовавшейся путем погружения и замыкания клеточной мембраны. При этом в фагосоме экспрессируются ранние и поздние эндосомные маркеры, такие как EEA-1, LAMP-1 и Rab-7, но не маркер катепсин D, который является индикатором слияния фагосомы с лизосомой [9]. Следующим шагом во внутриклеточном перемещении бактерии является активное разрушение мембраны фагосомы с последующим уходом в цитозоль, где она затем активно реплицируется. Нет единого мнения ученых о процессах подкисления фагосомы до разрушения мембраны бактериями *F. tularensis*. Проводились исследования, в которых продемонстрировано прогрессирующее закисление вакуоли за счет экспрессии V-АТФазы до разрушения мембраны фагосомы [14], в то же время имеются противоречивые данные, исключающие подкисление фагосомы [15]. До сих пор не выяснено, связано ли это несоответствие с разными экспериментальными условиями или разными штаммами *F. tularensis*.

Долгое время считали, что вирулентность *F. tularensis* зависит от способности бактерий реплицироваться в фагоцитарных клетках макроорганизма. Проведенные исследования по изучению способности штаммов *F. tularensis* размножаться в макрофагах и дендритных клетках различных тканей макро-

организма показали, что бактерии *F. tularensis* при заражении *in vitro* способны размножаться в перитонеальных, альвеолярных макрофагах, дендритных клетках крыс, мышей и морских свинок, а также в моноцитах периферической крови и дендритных клетках человека [2]. В экспериментах по заражению фагоцитов *in vitro* выявлено, что при отсутствии экзогенных факторов активации клеток, например INF-γ, внутриклеточная репликация штамма *F. tularensis* LVS продолжается неограниченно до гибели клетки-хозяина, а именно по каспазо-3-зависимому апоптозу клеток [16]. Известно, что вирулентный штамм *F. tularensis* SchuS4 подвиды *tularensis* также индуцирует каспазо-3-зависимый апоптоз резидентных макрофагов мыши. Полученные результаты подтверждают возможность неограниченного роста *F. tularensis*, вызывая апоптоз инфицированных клеток как *in vivo*, так и *in vitro* [17].

В исследовании на макрофагах продемонстрировано, что *F. tularensis* проникает в фагоциты и быстро покидает фагосому, размножаясь в цитозоле, тем самым избегая слияния фагосомы с лизосомой и связанных с этим последующих бактерицидных эффектов. В макрофагах, полученных из моноцитов периферической крови людей и обработанных INF-γ, наблюдался контроль роста штамма *F. novicida*, так как INF-γ нарушал способность бактерий уклоняться от слияния фагосомы с лизосомой. Полученные данные демонстрируют, что механизм предотвращения выхода *F. tularensis* из фагосомы является INF-γ-зависимым, присутствие данного цитокина приводит к ингибированию внутриклеточного роста бактерий [2]. Однако при изучении роста штаммов *F. tularensis* LVS и *F. tularensis* SchuS4 в макрофагах костного мозга мышей и в макрофагоподобной клеточной линии J774.1 установили, что INF-γ-опосредованная активация клеток не влияет на выход бактерий из фагосомы [15, 18]. Вероятнее всего, данные расхождения связаны с использованием в вышеупомянутых исследованиях макрофагов разного происхождения, а также штаммов *F. tularensis* различных подвидов.

Заслуживают внимания сообщения о том, что индуцированная INF-γ активация клеток, приводящая к предотвращению выхода бактерий *F. tularensis* из фагосомы, не является единственным механизмом, с помощью которого INF-γ ограничивает рост бактерий внутри фагоцитов. Данные проведенных исследований подтверждают наличие двух хорошо известных классических механизмов: генерация активных форм кислорода и азота, опосредованных INF-γ, которые могут подавлять внутриклеточное размножение штаммов *F. tularensis* SchuS4 и *F. tularensis* LVS как *in vitro*, так и *in vivo* [19, 20]. Полученные результаты показывают, что индуцированные INF-γ бактерицидные механизмы, участвующие в ингибировании роста вирулентного штамма *F. tularensis* SchuS4 в активированных макрофагах, еще предстоит определить, в то время как штамм

F. tularensis LVS оказался более чувствительным к бактерицидным эффектам.

Установлено, что вирулентные штаммы *F. tularensis* способны противодействовать активации фагоцитов и продукции ими провоспалительных цитокинов. Штамм *F. tularensis* SchuS4 подвида *tularensis* подавляет синтез IFN- γ фагоцитами, индуцируя выработку простагландина- E_2 инфицированными клетками, который ингибирует синтез IFN- γ [21]. Вирулентные штаммы *F. tularensis* также активно подавляют активацию дендритных клеток человека и мыши, нарушая синтез провоспалительных цитокинов. Это, по-видимому, обусловлено способностью вирулентного штамма *F. tularensis* SchuS4 увеличивать продукцию иммуносупрессивного цитокина TGF- β (индикатор альтернативной активации макрофагов), а также подавлять экспрессию CD14 дендритными клетками легких [3].

Помимо этого, бактерии *F. tularensis* способны размножаться в нейтрофилах [22]. Показано, что истощение популяции нейтрофилов у мышей приводит к высокой восприимчивости к парентеральному заражению возбудителем туляремии [23]. Вместе с тем выявлено, что нейтрофилы играют неоднозначную роль при туляремийной инфекции. Несмотря на активное размножение бактерий *F. tularensis* в нейтрофилах, они сохраняют способность секретировать цитокины и хемокины, которые привлекают другие эффекторные клетки к очагу инфекции [2]. Истощение популяции нейтрофилов у мышей приводило лишь к незначительному увеличению бактериальной нагрузки в печени [23]. В другом исследовании показано, что нейтрофилы составляют до 50 % клеток, инфицированных *F. tularensis* в легких у мышей через трое суток после заражения штаммами *F. tularensis* LVS или *F. tularensis* SchuS4 [24].

В ряде работ выявлено активное участие тучных клеток и NK-клеток в иммунном ответе при инфицировании штаммами *F. tularensis*. Мыши, у которых была истощена популяция тучных клеток, оказались более восприимчивы к легочной инфекции, вызванной штаммом *F. tularensis* LVS, при этом у них наблюдалась сниженная продукция IL-4 в легких, в сравнении с мышами без иммунодефицита [25]. Показано, что NK-клетки играют роль в раннем периоде иммунного ответа, синтезируя IFN- γ совместно с другими клетками врожденной иммунной системы [2]. S.M. Bokhari *et al.* выявили, что у мышей, дефицитных по NK-клеткам, во время интраназальной туляремийной инфекции наблюдалось снижение уровня IFN- γ в сыворотке на 50 % по сравнению с мышами дикого типа [26].

Адаптивный иммунный ответ. Адаптивные иммунные реакции обычно развиваются в течение более длительного периода времени, чем врожденный иммунитет, так как для них изначально требуется активация и клональная экспансия антиген-специфических В- и Т-клеток. Активированные В- и Т-клетки памяти быстрее реагируют на повторное

воздействие специфического антигена, тем самым формируя основу протективного поствакцинального иммунитета.

Ранние методы изучения противотуляремийного иммунитета основывались на переносе иммунной сыворотки интактным животным. У мышей введение иммунной сыворотки обеспечивало некоторую защиту от легочной инфекции, вызванной штаммами *F. tularensis* LVS и *F. novicida* [27]. Вместе с тем введение сыворотки, полученной от животных, иммунизированных штаммом *F. tularensis* LVS, не обеспечивало защиты мышам линии BALB/c от легочной инфекции, вызванной штаммом *F. tularensis* SchuS4 [28]. В исследовании, проведенном G.R. Klimpel *et al.*, показано, что сыворотка, полученная от мышей BALB/c после введения им штамма *F. tularensis* LVS и выведенных левофлоксацином, обладала протективным эффектом [29]. Другими группами исследователей установлено, что механизм защиты в результате переноса иммунной сыворотки обусловлен Fc γ R-опосредованным фагоцитозом и антитело-зависимой цитотоксичностью NK-клеток [27, 30].

В-клетки хорошо известны своей способностью дифференцироваться в плазматические клетки, секретирующие антитела в ответ на чужеродные антигены. Туляремийная инфекция индуцирует синтез специфических антител против антигенов, в основном ЛПС *F. tularensis*, как у мышей, так и у человека [2]. Вместе с тем в литературе описаны и другие иммуногенные белки: ForA и OmpA внешней мембраны, а также внутриклеточные белки GroEL и KatG [27]. В ряде исследований установлено, что антитела к ЛПС *F. tularensis* обеспечивали протективный эффект при внутрикожном и внутрибрюшинном введении мышам летальной дозы штамма *F. tularensis* LVS [2, 31].

В свою очередь, D.D. Crane *et al.* обнаружили, что вирулентные штаммы *F. tularensis* subsp. *tularensis*, в частности штамм *F. tularensis* SchuS4, способны связывать плазмин-сериновую протеазу, которая обуславливает деградацию антител и приводит к ингибированию процесса опсонизации, а также к снижению эффективности процесса фагоцитоза бактерий данного подвида [32].

В некоторых работах продемонстрировано, что внутрикожная иммунизация штаммом *F. tularensis* LVS не обеспечивает защиты от интраназального заражения вирулентными штаммами *F. tularensis* FSC33/snMF и NMFTA1 подвида *tularensis*. В то же время интраназальная иммунизация штаммом *F. tularensis* LVS защищала мышей от подкожного и интраназального заражения вышеупомянутыми штаммами, что указывает на возможное участие IgA слизистой оболочки в формировании протективного противотуляремийного иммунитета [33]. Показано, что IgA обнаружены в сыворотке крови людей и мышей, а также в бронхолегочном лаваже иммунизированных мышей штаммом *F. tularensis* LVS [34, 35].

Таким образом, наличие специфических антител к антигенам *F. tularensis* является индикатором предшествующего вакцинального или инфекционного процессов. Бактерии *F. tularensis*, которые реплицируются внутриклеточно, могут быть недоступными для антител, но при временном нахождении вне инфицированной клетки антитела могут играть определенную роль в борьбе с туляремийной инфекцией посредством опсонизации и облегчения фагоцитоза [2].

В-клетки также способны регулировать специфические иммунные реакции с помощью дополнительных, независимых от антител механизмов [36]. S.J. Culkin *et al.* установили, что ранний протективный эффект, начиная с третьих суток после введения штамма *F. tularensis* LVS, зависит от наличия В-клеток и сопутствующего синтеза IFN- γ [31]. В опытах на животных показано, что введение вакцинного *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производных уже на третьи сутки индуцирует у мышей в крови и селезенке увеличение В-клеток, экспрессирующих молекулу CD69 (маркер ранней активации [37]), которая участвует в регуляции эффекторной функции лимфоцитов, и ко-стимулирующую молекулу CD86, что отражает усиление межклеточных взаимодействий [38].

Показано, что важность участия В-клеток в формировании протективного иммунитета зависит от уровня вирулентности заражающего штамма *F. tularensis*, а именно: чем выше вирулентность, тем более востребовано проявление эффекторных функций данной субпопуляцией [2]. В результате изучения протективных свойств вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производных (15/23-1 Δ recA и 15/23-1/sodB Δ recA) установлено, что у иммунизированных мышей наблюдалось антиген-индуцированное повышение процентного содержания В-клеток, синтезирующих IFN- γ . В этом же исследовании [38] выявлено, что при стимуляции В-клеток *in vitro* туляремийным антигеном происходила их активация, о чем свидетельствовало увеличение пулов CD19⁺ клеток, экспрессирующих молекулы CD69 и CD25 – лиганд IL-2, который при связывании усиливает пролиферативный потенциал клетки [39]. Исследование, направленное на определение критериев защиты от вирулентного штамма *F. tularensis* SchuS4, показало, что выживаемость мышей после первичного инфицирования коррелировала с наличием $\alpha\beta$ - и $\gamma\delta$ T-клеток, а также В-клеток [40], подтверждая возможность В-клеток модулировать иммунные реакции не только продукцией специфических антител, но и посредством прямых контактов с другими иммунокомпетентными клетками и синтезом цитокинов [41]. В связи с этим разработка критериев оценки иммунологической эффективности вакцинации должна быть сосредоточена на понимании механизмов реализации эффекторных функций В- и Т-клеток.

Иммунологические корреляты протекции: Т-клетки и их эффекторные функции. При внутриклеточных инфекциях ключевая роль в форми-

ровании протективного иммунитета и уничтожении патогенов отводится $\alpha\beta$ T-клеткам [2, 4, 7]. В пуле $\alpha\beta$ T-клеток выделяют две основных субпопуляции: CD4⁺ (Т-хелперы) и CD8⁺ (цитотоксические Т-лимфоциты). Согласно литературным данным, протективный поствакцинальный и постинфекционный иммунитет формируется при активном участии CD4⁺ и CD8⁺ $\alpha\beta$ T-клеток. Истощение CD4⁺ или CD8⁺ субпопуляции $\alpha\beta$ T-клеток у иммунных мышей линий BALB/c и C57BL/6 приводит к летальному исходу с небольшими различиями в продолжительности жизни [2, 33].

В литературе также встречаются данные о других малых субпопуляциях Т-клеток, которые вносят определенный вклад в формирование протективного иммунитета против *F. tularensis*. К таким субпопуляциям относятся $\gamma\delta$ T-лимфоциты и дважды отрицательные (CD4⁻CD8⁻) $\alpha\beta$ T-клетки. В то время как CD4⁺ и CD8⁺ $\alpha\beta$ T-клетки имеют ключевое значение при первичной и вторичной туляремийной инфекции у мышей и людей, участие $\gamma\delta$ T-клеток не является обязательным, что было продемонстрировано в опытах на мышах при моделировании экспериментальной туляремии. Обнаружено, что $\gamma\delta$ TCR^{-/-} мыши восприимчивы к интраназальной сублетальной инфекции, вызванной штаммом *F. tularensis* LVS, в равной степени, как и мыши дикого типа [42]. Однако показано, что в крови переболевших туляремией людей значительно увеличивалось содержание субпопуляции $\gamma\delta$ T-клеток через один месяц после инфицирования [43]. По-видимому, у переболевших людей $\gamma\delta$ T-клетки периферической крови предотвращают развитие туляремийной инфекции посредством формирования IFN- γ -зависимого механизма, приводящего к ослаблению или задержке роста туляремийного микроба [44]. Таким образом, полученные результаты демонстрируют определенный вклад $\gamma\delta$ T-клеток в формирование противотуляремийного иммунного ответа. Показано, что CD4⁻CD8⁻ $\alpha\beta$ T-клетки принимают участие в формировании противотуляремийного иммунитета при интраназальной иммунизации, способствуя дифференцировке моноцитов в дендритные клетки и поддерживая иммунный ответ CD4⁺ и CD8⁺ $\alpha\beta$ T-клеток [45].

Основной целью вакцинации против внутриклеточных инфекций является индукция Т-клеток памяти. Иммунологическая память – результат клональной экспансии и дифференцировки антиген-специфических Т-клеток, которые сохраняются длительное время или на протяжении всей жизни. После первичной встречи с *F. tularensis* и угасания эффекторной фазы иммунного ответа антиген-специфические CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоциты дифференцируются в клетки памяти, среди которых выделяют субпопуляции центральных (T_{CM}) и эффекторных (T_{EM}) Т-клеток памяти, участвующих в развитии иммунологических реакций при повторной встрече с антигенами *F. tularensis* [46].

Несмотря на важную роль Т-клеток памяти в формировании протективного иммунитета при туляремии, работ по изучению их субпопуляционного состава, функциональной активности и длительности сохранения после вакцинации немного. Основная часть опубликованных исследований проведена с использованием штамма *F. tularensis* LVS. Показано, что у людей, привитых препаратом, полученным из штамма *F. tularensis* LVS, индуцируется генерация T_{EM} [6] и T_{CM} [4]. К. Eneslätt *et al.* отмечают, что после введения добровольцам препарата, полученного на основе штамма *F. tularensis* LVS, $CD4^+$ и $CD8^+$ T_{CM} -клетки, продуцирующие IFN- γ , сохраняются более 25 лет [4].

Исследования на моделях лабораторных животных сосредоточены на изучении иммунологических реакций, отражающих поствакцинальную защиту против вирулентных штаммов *F. tularensis*, как правило, на 21–28-е сутки после вакцинации, т.е. временного интервала, когда происходит активное формирование специфического протективного иммунитета [27, 33]. Тем не менее при определении критериев иммунологической эффективности вакцинации живой туляремийной вакциной важно изучить их динамику после окончания активной фазы и оценить роль в обеспечении длительного протективного иммунитета. В работе по изучению длительности иммунитета показано, что иммунизация штаммом *F. tularensis* LVS индуцировала формирование протективного иммунитета у мышей, о чем свидетельствовало отсутствие гибели животных после их заражения вирулентным штаммом *F. tularensis* ShuS4 на 30-е и 90-е сутки. Протективный эффект иммунизации обусловлен генерацией $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток памяти в селезенке и легких и синтезом ими IFN- γ . Однако в данном исследовании детально не изучены механизмы формирования Т-клеточной иммунологической памяти, а именно влияние вакцинации на дифференцировку T_{CM} и T_{EM} и их функциональную активность [47]. В другом исследовании показано, что бустерная интраназальная иммунизация штаммом *F. tularensis* LVS обеспечивает эффективную защиту от интраназального заражения через 30 суток вирулентным штаммом *F. tularensis* ShuS4 посредством индукции $CD4^+$ и $CD8^+$ T_{EM} в легких и синтезом IL-17A и IFN- γ . Вместе с тем при инфицировании животных через 60 суток по аналогичной схеме иммунизации все животные погибали. Авторы пришли к выводу, что через месяц после последней иммунизации наличие $CD4^+$ и $CD8^+$ T_{EM} обеспечивает защитный иммунитет, однако через два месяца после последней иммунизации и окончания первичного иммунного ответа большая часть эффекторных клеток элиминируется и защиты не наблюдается [46]. Полученные данные подчеркивают важность генерации субпопуляции T_{CM} после вакцинации, индукция которых может опосредовать устойчивый длительный иммунитет.

Исследования, проведенные на мышах, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ,

также показали, что вакцинация индуцировала формирование антиген-специфичных $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток памяти, их дифференцировку на субпопуляции T_{EM} и T_{CM} , которые проявляли свою эффекторную функцию посредством экспрессии молекулы CD69 и продукции цитокинов IFN- γ и TNF- α [48, 49]. Установлено, что снижение количества и угасание функциональной активности субпопуляций $CD8^+$ T_{CM} и T_{EM} в отдаленные сроки после вакцинации (60-е и 90-е сутки) штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ приводило к ослаблению защиты после заражения мышей природным штаммом *F. tularensis* Schu subsp. *tularensis* [49]. Согласно литературным данным, одним из объяснений угасания протективного иммунитета против внутриклеточных инфекций с течением времени является снижение пула долгоживущих T_{CM} [50, 51]. Авторы предполагают, что истощение $CD8^+$ T_{CM} , являющихся предшественниками $CD8^+$ T_{EM} , с увеличением поствакцинального периода приводило к снижению количества и функциональной активности $CD8^+$ T_{EM} на 60-е и 90-е сутки после вакцинации мышей штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

Одним из важных аспектов разработки вакцины является выявление эффекторных функций иммунокомпетентных клеток, необходимых для борьбы с инфекцией. В периферической крови людей, выздоравливающих от туляремийной инфекции, обнаруживаются цитокины IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-17 и IL-22, продуцирующиеся Т-клетками, что указывает на индуцирование инфекцией или вакцинацией синтеза данных цитокинов [2, 4, 5]. Из вышеизложенного следует заключить, что необходимо оценивать роль данных цитокинов в формировании защитного иммунитета у животных в экспериментах по изучению иммуногенных и протективных свойств новых вакцинных штаммов.

Предположения о том, что для формирования протективного иммунитета необходимо наличие классических Th1-цитокинов, подтверждены на мышинной модели несколькими группами исследователей, которые показали, что ключевыми цитокинами в реализации противотуляремийного иммунитета являются IFN- γ и TNF- α [40, 52, 53]. IL-17A также продуцируется $CD4^+$, дважды отрицательными $CD4^-CD8^-$ и $\gamma\delta$ Т-клетками во время легочной инфекции мышей при введении им штамма *F. tularensis* LVS, но отсутствует при подкожном заражении животных [21, 42]. Несколькими группами ученых показано, что IL-17A имеет большое значение во время первичной респираторной инфекции, вызванной штаммом *F. tularensis* LVS: мыши, дефицитные по IL-17A, оказались более восприимчивы к легочной инфекции в сравнении с мышами дикого типа [21, 42, 52, 53]. Следовательно, для оценки протективности противотуляремийного Т-клеточного иммунитета одновременное определение продукции IFN- γ , TNF- α и IL-17A является более информативным и указывает на то, что кандидат в вакцинный штамм

должен индуцировать генерацию полифункциональных Т-клеток [54].

Таким образом, анализ публикаций по проведенным исследованиям с применением современных информативных методов показал значительный прогресс в понимании участия различных субпопуляций Т-клеток в иммунном ответе на *F. tularensis*. Одновременное изучение экспрессии маркеров активации, рецепторов хоминга, хемокиновых рецепторов и спектра продуцируемых цитокинов Т-клеток позволит полнее понимать механизмы формирования Т-клеточной иммунологической памяти.

На сегодняшний день известно, что вид вакцины оказывает прямое влияние на тип запускаемых эффекторных лимфоцитов, которые опосредуют протективный иммунитет [55]. Для формирования протективного иммунитета против *F. tularensis* необходимо, чтобы вакцина индуцировала генерацию антиген-специфических В-клеток и CD4⁺, CD8⁺ Т-клеток. В настоящий момент активацию эффекторных лимфоцитов обеспечивают только живые вакцины, полученные на основе аттенуированных штаммов *F. tularensis* [2].

Проводя поиск критериев оценки протективного иммунитета при туляремии, главным образом, необходимо изучать активацию и эффекторные функции CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток памяти с фенотипами в T_{EM} и T_{CM}, а также определять длительность их циркуляции после вакцинации [2]. Изучение маркеров активации и спектра продуцируемых цитокинов T_{EM} и T_{CM} позволит определить, какой тип Т-клеток памяти индуцирует исследуемая вакцина, и значительно расширит представление о функциональной активности этих субпопуляций и их роли в обеспечении эффективной защиты от туляремийной инфекции.

Выявленные критерии оценки противотуляремийного иммунитета будут способствовать более объективному подходу к отбору перспективных штаммов-кандидатов в вакцинные при экспериментальной туляремии на модели животных и, возможно, в дальнейшем будут служить критериями оценки иммунологической эффективности вакцинации у людей.

Таким образом, основной задачей вакцинологии в контексте туляремийной инфекции является изучение механизмов, с помощью которых реализуется защита и происходит формирование Т-клеточной иммунологической памяти. Знание клеточных механизмов и идентификация субпопуляций Т-клеток памяти, обеспечивающих протективность и длительность противотуляремийного иммунитета, может дать ключ к рациональному конструированию более эффективных вакцин.

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

Финансирование. Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора на 2021–2025 гг. «Изучение механизмов иммунопатогенеза возбудителей инфекционных заболеваний».

Список литературы

1. Кудрявцева Т.Ю., Попов В.П., Мокриевич А.Н., Куликалова Е.С., Холин А.В., Мазепа А.В., Транквиловский Д.В., Храмов М.В., Дятлов И.А. Генетическое разнообразие семейства *Francisellaceae*, анализ ситуации по заболеваемости туляремией на территории Российской Федерации в 2021 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 1:6–14. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-1-6-14.
2. 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.
3. Jia Q., Horwitz M.A. Live attenuated tularemia vaccines for protection against respiratory challenge with virulent *F. tularensis* subsp. *tularensis*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2018; 8:154. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00154.
4. Eneslätt K., Normark M., Björk R., Rietz C., Zingmark C., Wolfrim L.A., Stöven S., Sjöstedt A. Signatures of T cells as correlates of immunity to *Francisella tularensis*. *PLoS One*. 2012; 7(3): e32367. DOI: 10.1371/journal.pone.0032367.
5. Nicol M.J., Williamson D.R., Place D.E., Kirimanjeswara G.S. Differential immune response following intranasal and intradermal infection with *Francisella tularensis* implications for vaccine development. *Microorganisms*. 2021; 9(5):973. DOI: 10.3390/microorganisms9050973.
6. Salerno-Gonçalves R., Hepburn M.J., Bavari S., Szein M.B. Generation of heterogeneous memory T cells by live attenuated tularemia vaccine in humans. *Vaccine*. 2009; 28(1):195–206. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.09.100.
7. Seder R.A., Darrah P.A., Roederer M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat. Rev. Immunol.* 2008; 8(4):247–58. DOI: 10.1038/nri2274.
8. Kubelkova K., Macela A. Innate immune recognition: an issue more complex than expected. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019; 9:241. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00241.
9. Krocova Z., Macela A., Kubelkova K. Innate immune recognition: implications for the interaction of *Francisella tularensis* with the host immune system. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2017; 7:446. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00446.
10. Ashtekar A.R., Zhang P., Katz J., Deivanayagam C.C., Rallabhandi P., Vogel S.N., Michalek S.M. TLR4-mediated activation of dendritic cells by the heat shock protein DnaK from *Francisella tularensis*. *J. Leukoc. Biol.* 2008; 84(6):1434–46. DOI: 10.1189/jlb.0308215.
11. Malik M., Bakshi C.S., Sahay B., Shah A., Lotz S.A., Sellati T.J. Toll-like receptor 2 is required for control of pulmonary infection with *Francisella tularensis*. *Infect. Immun.* 2006; 74(6):3657–62. DOI: 10.1128/IAI.02030-05.
12. Geier H., Celli J. Phagocytic receptors dictate phagosomal escape and intracellular proliferation of *Francisella tularensis*. *Infect. Immun.* 2011; 79(6):2204–14. DOI: 10.1128/IAI.01382-10.
13. Clay C.D., Soni S., Gunn J.S., Schlesinger L.S. Evasion of complement-mediated lysis and complement C3 deposition are regulated by *Francisella tularensis* lipopolysaccharide O antigen. *J. Immunol.* 2008; 181(8):5568–78. DOI: 10.4049/jimmunol.181.8.5568.
14. Chong A., Wehrly T.D., Nair V., Fischer E.R., Barker J.R., Klose K.E., Celli J. The early phagosomal stage of *Francisella tularensis* determines optimal phagosomal escape and *Francisella* pathogenicity island protein expression. *Infect. Immun.* 2008; 76(12):5488–99. DOI: 10.1128/IAI.00682-08.
15. Bönquist L., Lindgren H., Golovliov I., Guina T., Sjöstedt A. MglA and Igl proteins contribute to the modulation of *Francisella tularensis* live vaccine strain-containing phagosomes in murine macrophages. *Infect. Immun.* 2008; 76(8):3502–10. DOI: 10.1128/IAI.00226-08.
16. Lai X.H., Sjöstedt A. Delineation of the molecular mechanisms of *Francisella tularensis*-induced apoptosis in murine macrophages. *Infect. Immun.* 2003; 71(8):4642–6. DOI: 10.1128/IAI.71.8.4642-4646.2003.
17. Wickstrum J.R., Bokhari S.M., Fischer J.L., Pinson D.M., Yeh H.W., Horvat R.T., Parmely M.J. *Francisella tularensis* induces extensive caspase-3 activation and apoptotic cell death in the tissues of infected mice. *Infect. Immun.* 2009; 77(11):4827–36. DOI: 10.1128/IAI.00246-09.
18. Edwards J.A., Rockx-Brouwer D., Nair V., Celli J. Restricted cytosolic growth of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* by IFN- γ activation of macrophages. *Microbiology (Reading)*. 2010; 156(Pt. 2):327–39. DOI: 10.1099/mic.0.031716-0.
19. Lindgren H., Stenman L., Tärnvik A., Sjöstedt A. The contribution of reactive nitrogen and oxygen species to the killing of *Francisella tularensis* LVS by murine macrophages. *Microbes Infect.* 2005; 7(3):467–75. DOI: 10.1016/j.micinf.2004.11.020.
20. Lindgren H., Shen H., Zingmark C., Golovliov I., Conlan W., Sjöstedt A. Resistance of *Francisella tularensis* strains against reactive nitrogen and oxygen species with special reference to the role of KatG. *Infect. Immun.* 2007; 75(3):1303–9. DOI: 10.1128/IAI.01717-06.

21. Woolard M.D., Hensley L.L., Kawula T.H., Frelinger J.A. Respiratory *Francisella tularensis* live vaccine strain infection induces Th17 cells and prostaglandin E2, which inhibits generation of gamma interferon-positive T cells. *Infect. Immun.* 2008; 76(6):2651–9. DOI: 10.1128/IAI.01412-07.
22. McCaffrey R.L., Allen L.A. *Francisella tularensis* LVS evades killing by human neutrophils via inhibition of the respiratory burst and phagosome escape. *J. Leukoc. Biol.* 2006; 80(6):1224–30. DOI: 10.1189/jlb.0406287.
23. Conlan J.W., KuoLee R., Shen H., Webb A. Different host defences are required to protect mice from primary systemic vs pulmonary infection with the facultative intracellular bacterial pathogen, *Francisella tularensis* LVS. *Microb. Pathog.* 2012; 32(3):127–34. DOI: 10.1006/mpat.2001.0489.
24. Guo Y., Sun X., Shibata K., Yamada H., Muta H., Podack E.R., Yoshikai Y. CD30 is required for activation of a unique subset of interleukin-17A-producing $\gamma\delta$ T cells in innate immunity against *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin infection. *Infect. Immun.* 2013; 81(10):3923–34. DOI: 10.1128/IAI.00887-13.
25. Keating S.M., Bejon P., Berthoud T., Vuola J.M., Todryk S., Webster D.P., Dunachie S.J., Moorthy V.S., McConkey S.J., Gilbert S.C., Hill A.V. Durable human memory T cells quantifiable by cultured enzyme-linked immunospot assays are induced by heterologous prime boost immunization and correlate with protection against malaria. *J. Immunol.* 2005; 175(9):5675–80. DOI: 10.4049/jimmunol.175.9.5675.
26. Bokhari S.M., Kim K.J., Pinson D.M., Slusser J., Yeh H.W., Parmely M.J. NK cells and gamma interferon coordinate the formation and function of hepatic granulomas in mice infected with the *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Infect. Immune.* 2008; 76(4):1379–89. DOI: 10.1128/IAI.00745-07.
27. Kirimanjeswara G.S., Olmos S., Bakshi C.S., Metzger D.W. Humoral and cell-mediated immunity to the intracellular pathogen *Francisella tularensis*. *Immunol. Rev.* 2008; 225:244–55. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2008.00689.x.
28. Kinkead L.C., Allen L.A. Multifaceted effects of *Francisella tularensis* on human neutrophil function and lifespan. *Immunol. Rev.* 2016; 273(1):266–81. DOI: 10.1111/imr.12445.
29. Klimpel G.R., Eaves-Pyles T., Moen S.T., Taormina J., Peterson J.W., Chopra A.K., Niesel D.W., Carness P., Haitcoat J.L., Kirtley M., Nasr A.B. Levofloxacin rescues mice from lethal intranasal infections with virulent *Francisella tularensis* and induces immunity and production of protective antibody. *Vaccine.* 2008; 26(52):6874–82. DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.09.077.
30. Sanapala S., Yu J.J., Murthy A.K., Li W., Guentzel M.N., Chambers J.P., Klose K.E., Arulanandam B.P. Perforin- and granzyme-mediated cytotoxic effector functions are essential for protection against *Francisella tularensis* following vaccination by the defined *F. tularensis* subsp. *novicida* Δ fopC vaccine strain. *Infect. Immun.* 2012; 80(6):2177–85. DOI: 10.1128/IAI.00036-12.
31. Cullin 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.
32. Crane D.D., Warner S.L., Bosio C.M. A novel role for plasmin-mediated degradation of opsonizing antibody in the evasion of host immunity by virulent, but not attenuated, *Francisella tularensis*. *J. Immunol.* 2009; 183(7):4593–600. DOI: 10.4049/jimmunol.0901655.
33. Wayne Conlan J., Shen H., Kuolee R., Zhao X., Chen W. Aerosol-, but not intradermal-immunization with the live vaccine strain of *Francisella tularensis* protects mice against subsequent aerosol challenge with a highly virulent type A strain of the pathogen by an alpha beta T cell- and interferon gamma- dependent mechanism. *Vaccine.* 2005; 23(19):2477–85. DOI: 10.1016/j.vaccine.2004.10.034.
34. Lavine C.L., Clinton S.R., Angelova-Fischer I., Marion T.N., Bina X.R., Bina J.E., Whitt M.A., Miller M.A. Immunization with heat-killed *Francisella tularensis* LVS elicits protective antibody-mediated immunity. *Eur. J. Immunol.* 2007; 37(11):3007–20. DOI: 10.1002/eji.200737620.
35. Rawool D.B., Bitsaktsis C., Li Y., Gosselin D.R., Lin Y., Kurkure N.V., Metzger D.W., Gosselin E.J. Utilization of Fc receptors as a mucosal vaccine strategy against an intracellular bacterium, *Francisella tularensis*. *J. Immunol.* 2008; 180(8):5548–57. DOI: 10.4049/jimmunol.180.8.5548.
36. 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.
37. Vega-Ramos J., Alari-Pahissa E., Valle J.D., Carrasco-Marín E., Esplughes 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/icb.2010.62.
38. 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; 3:62–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-62-69.
39. Amu S., Gjertsson I., Brisselt 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.
40. 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(3):e33349. DOI: 10.1371/journal.pone.0033349.
41. Vascotto F., Le Roux D., Lankar D., Faure-André G., Vargas P., Guernonprez P., Lennon-Duménil A.M. Antigen presentation by B lymphocytes: how receptor signaling directs membrane trafficking. *Curr. Opin. Immunol.* 2007; 19(1):93–8. DOI: 10.1016/j.coi.2006.11.011.
42. Poquet Y., Kroca M., Halary F., Stenmark S., Peyrat M.A., Bonneville M., Fournié J.J., Sjöstedt A. Expansion of Vgamma9 Vdelta2 T cells is triggered by *Francisella tularensis*-derived phosphoantigens in tularemia but not after tularemia vaccination. *Infect. Immun.* 1998; 66(5):2107–14. DOI: 10.1128/IAI.66.5.2107-2114.1998.
43. Rowland C.A., Hartley M.G., Flick-Smith H., Laws T.R., Eyles J.E., Oyston P.C. Peripheral human $\gamma\delta$ T cells control growth of both avirulent and highly virulent strains of *Francisella tularensis* in vitro. *Microbes Infect.* 2012; 14(7-8):584–9. DOI: 10.1016/j.micinf.2012.02.001.
44. Meierovics A., Yankelovich W.J., Cowley S.C. MAIT cells are critical for optimal mucosal immune responses during in vivo pulmonary bacterial infection. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2013; 110(33):E3119–28. DOI: 10.1073/pnas.1302799110.
45. Meierovics A.I., Cowley S.C. MAIT cells promote inflammatory monocyte differentiation into dendritic cells during pulmonary intracellular infection. *J. Exp. Med.* 2016; 213(12):2793–809. DOI: 10.1084/jem.20160637.
46. Bar-On L., Cohen H., Elia U., Rotem S., Bercovich-Kinori A., Bar-Haim E., Chitlaru T., Cohen O. Protection of vaccinated mice against pneumonic tularemia is associated with an early memory sentinel-response in the lung. *Vaccine.* 2017; 35(50):7001–9. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.10.053.
47. Anderson R.V., Crane D.D., Bosio C.M. Long lived protection against pneumonic tularemia is correlated with cellular immunity in peripheral, not pulmonary, organs. *Vaccine.* 2010; 28(40):6562–72. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.07.072.
48. Карцева А.С., Силкина М.В., Титарева Г.М., Вахрамеева Г.М., Комбарова Т.И., Миронова Р.И., Павлов В.М., Мокриевич А.Н., Фирстова В.В. Влияние вакцинации штаммом *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ и его производными на генерацию и функциональную активность Т-клеток памяти у мышей. *Биотехнология.* 2022; 38(3):49–61. DOI: 10.56304/S0234275822030024.
49. Карцева А.С., Силкина М.В., Титарева Г.М., Комбарова Т.И., Миронова Р.И., Фирстова В.В. Оценка длительности сохранения Т-клеток памяти у мышей после иммунизации живой туляремийной вакциной. *Медицинская иммунология.* 2023; 25(3):673–8. DOI: 10.15789/1563-0625-EOT-2746.
50. Hena-Tamayo M.I., Ordway D.J., Irwin S.M., Shang S., Shanley C., Orme I.M. Phenotypic definition of effector and memory T-lymphocyte subsets in mice chronically infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Vaccine Immunol.* 2010; 17(4):618–25. DOI: 10.1128/CVI.00368-09.
51. Ericsson M., Sandström G., Sjöstedt A., Tärnvik A. Persistence of cell-mediated immunity and decline of humoral immunity to the intracellular bacterium *Francisella tularensis* 25 years after natural infection. *J. Infect. Dis.* 1994; 170(1):110–4. DOI: 10.1093/infdis/170.1.110.
52. Roberts L.M., Davies J.S., Sempowski G.D., Frelinger J.A. IFN- γ , but not IL-17A, is required for survival during secondary pulmonary *Francisella tularensis* live vaccine strain infection. *Vaccine.* 2014; 32(29):3595–603. DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.05.013.
53. Cowley S.C., Meierovics A.I., Frelinger J.A., Iwakura Y., Elkins K.L. Lung CD4-CD8- double-negative T cells are prominent producers of IL-17A and IFN-gamma during primary respiratory murine infection with *Francisella tularensis* live vaccine strain. 2010; 184(10):5791–801. DOI: 10.4049/jimmunol.1000362.
54. Abel B., Tameris M., Mansoor N., Gelderbloem S., Hughes J., Abrahams D., Makhethle L., Erasmus M., de Kock M., van der Merwe L., Hawkrigge A., Veldsman A., Hatherill M., Schirru G., Pau M.G., Hendriks J., Weverling G.J., Goudsmit J., Sizemore D., McClain J.B., Goetz M., Gearhart J., Mahomed H., Hussey G.D., Sadoff J.C., Hanekom W.A. The novel tuberculosis vaccine, AERAS-402, induces robust and polyfunctional CD4+ and CD8+ T cells in adults. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2010; 181(12):1407–17. DOI: 10.1164/rccm.200910-1484OC.
55. Seder R.A., Hill A.V. Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity. *Nature.* 2000; 406(6797):793–8. DOI: 10.1038/35021239.

References

- Kudryavtseva T.Yu., Popov V.P., Mokrievich A.N., Kulikalova E.S., Kholin A.V., Mazepa A.V., Trankvilevsky D.V., Khranov M.V., Dyatlov I.A. [Genetic diversity of the family *Francisellaceae*, analysis of the situation on tularemia incidence in the Russian Federation in 2021, and forecast for 2022]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; (1):6–14. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-1-6-14.
- 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.
- Jia Q., Horwitz M.A. Live attenuated tularemia vaccines for protection against respiratory challenge with virulent *F. tularensis* subsp. *tularensis*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2018; 8:154. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00154.
- Enesl tt K., Normark M., Bj rk R., Rietz C., Zingmark C., Wolfr m L.A., St ven S., S j stedt A. Signatures of T cells as correlates of immunity to *Francisella tularensis*. *PLoS One*. 2012; 7(3): e32367. DOI: 10.1371/journal.pone.0032367.
- Nicol M.J., Williamson D.R., Place D.E., Kirimanjeswara G.S. Differential immune response following intranasal and intradermal infection with *Francisella tularensis* implications for vaccine development. *Microorganisms*. 2021; 9(5):973. DOI: 10.3390/microorganisms9050973.
- Salerno-Gon alves R., Hepburn M.J., Bavari S., S tein M.B. Generation of heterogeneous memory T cells by live attenuated tularemia vaccine in humans. *Vaccine*. 2009; 28(1):195–206. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.09.100.
- S der R.A., Darrah P.A., Roederer M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat. Rev. Immunol.* 2008; 8(4):247–58. DOI: 10.1038/nri2274.
- Kubelkova K., Macela A. Innate immune recognition: an issue more complex than expected. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019; 9:241. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00241.
- Krocova Z., Macela A., Kubelkova K. Innate immune recognition: implications for the interaction of *Francisella tularensis* with the host immune system. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2017; 7:446. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00446.
- Ashtekar A.R., Zhang P., Katz J., Deivanayagam C.C., Rallabhandi P., Vogel S.N., Michalek S.M. TLR4-mediated activation of dendritic cells by the heat shock protein DnaK from *Francisella tularensis*. *J. Leukoc. Biol.* 2008; 84(6):1434–46. DOI: 10.1189/jlb.0308215.
- Malik M., Bakshi C.S., Sahay B., Shah A., Lotz S.A., Sellati T.J. Toll-like receptor 2 is required for control of pulmonary infection with *Francisella tularensis*. *Infect. Immun.* 2006; 74(6):3657–62. DOI: 10.1128/IAI.02030-05.
- Geier H., Celli J. Phagocytic receptors dictate phagosomal escape and intracellular proliferation of *Francisella tularensis*. *Infect. Immun.* 2011; 79(6):2204–14. DOI: 10.1128/IAI.01382-10.
- Clay C.D., Soni S., Gunn J.S., Schlesinger L.S. Evasion of complement-mediated lysis and complement C3 deposition are regulated by *Francisella tularensis* lipopolysaccharide O antigen. *J. Immunol.* 2008; 181(8):5568–78. DOI: 10.4049/jimmunol.181.8.5568.
- Chong A., Wehrly T.D., Nair V., Fischer E.R., Barker J.R., Klose K.E., Celli J. The early phagosomal stage of *Francisella tularensis* determines optimal phagosomal escape and *Francisella* pathogenicity island protein expression. *Infect. Immun.* 2008; 76(12):5488–99. DOI: 10.1128/IAI.00682-08.
- B nquist L., Lindgren H., Golovliov I., Guina T., S j stedt A. MglA and Igl proteins contribute to the modulation of *Francisella tularensis* live vaccine strain-containing phagosomes in murine macrophages. *Infect. Immun.* 2008; 76(8):3502–10. DOI: 10.1128/IAI.00226-08.
- Lai X.H., S j stedt A. Delineation of the molecular mechanisms of *Francisella tularensis*-induced apoptosis in murine macrophages. *Infect. Immun.* 2003; 71(8):4642–6. DOI: 10.1128/IAI.71.8.4642-4646.2003.
- Wickstr m J.R., Bokhari S.M., Fischer J.L., Pinson D.M., Yeh H.W., Horvat R.T., Parmely M.J. *Francisella tularensis* induces extensive caspase-3 activation and apoptotic cell death in the tissues of infected mice. *Infect. Immun.* 2009; 77(11):4827–36. DOI: 10.1128/IAI.00246-09.
- Edwards J.A., Rockx-Brouwer D., Nair V., Celli J. Restricted cytosolic growth of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* by IFN-  activation of macrophages. *Microbiology (Reading)*. 2010; 156(Pt. 2):327–39. DOI: 10.1099/mic.0.031716-0.
- Lindgren H., Stenman L., T rnvik A., S j stedt A. The contribution of reactive nitrogen and oxygen species to the killing of *Francisella tularensis* LVS by murine macrophages. *Microbes Infect.* 2005; 7(3):467–75. DOI: 10.1016/j.micinf.2004.11.020.
- Lindgren H., Shen H., Zingmark C., Golovliov I., Conlan W., S j stedt A. Resistance of *Francisella tularensis* strains against reactive nitrogen and oxygen species with special reference to the role of KatG. *Infect. Immun.* 2007; 75(3):1303–9. DOI: 10.1128/IAI.01717-06.
- Woolard M.D., Hensley L.L., Kawula T.H., Frelinger J.A. Respiratory *Francisella tularensis* live vaccine strain infection induces Th17 cells and prostaglandin E2, which inhibits generation of gamma interferon-positive T cells. *Infect. Immun.* 2008; 76(6):2651–9. DOI: 10.1128/IAI.01412-07.
- McCaffrey R.L., Allen L.A. *Francisella tularensis* LVS evades killing by human neutrophils via inhibition of the respiratory burst and phagosome escape. *J. Leukoc. Biol.* 2006; 80(6):1224–30. DOI: 10.1189/jlb.0406287.
- Conlan J.W., KuoLee R., Shen H., Webb A. Different host defences are required to protect mice from primary systemic vs pulmonary infection with the facultative intracellular bacterial pathogen, *Francisella tularensis* LVS. *Microb. Pathog.* 2012; 32(3):127–34. DOI: 10.1006/mpat.2001.0489.
- Guo Y., Sun X., Shibata K., Yamada H., Muta H., Podack E.R., Yoshikai Y. CD30 is required for activation of a unique subset of interleukin-17A-producing    T cells in innate immunity against *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Gu rin infection. *Infect. Immun.* 2013; 81(10):3923–34. DOI: 10.1128/IAI.00887-13.
- Keating S.M., Bejon P., Berthoud T., Vuola J.M., Todryk S., Webster D.P., Dunachie S.J., Moorthy V.S., McConkey S.J., Gilbert S.C., Hill A.V. Durable human memory T cells quantifiable by cultured enzyme-linked immunospot assays are induced by heterologous prime boost immunization and correlate with protection against malaria. *J. Immunol.* 2005; 175(9):5675–80. DOI: 10.4049/jimmunol.175.9.5675.
- Bokhari S.M., Kim K.J., Pinson D.M., Slusser J., Yeh H.W., Parmely M.J. NK cells and gamma interferon coordinate the formation and function of hepatic granulomas in mice infected with the *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Infect. Immun.* 2008; 76(4):1379–89. DOI: 10.1128/IAI.00745-07.
- Kirimanjeswara G.S., Olmos S., Bakshi C.S., Metzger D.W. Humoral and cell-mediated immunity to the intracellular pathogen *Francisella tularensis*. *Immunol. Rev.* 2008; 225:244–55. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2008.00689.x.
- Kinkead L.C., Allen L.A. Multifaceted effects of *Francisella tularensis* on human neutrophil function and lifespan. *Immunol. Rev.* 2016; 273(1):266–81. DOI: 10.1111/imr.12445.
- Klimpel G.R., Eaves-Pyles T., Moen S.T., Taormina J., Peterson J.W., Chopra A.K., Niesel D.W., Carness P., Haitcoat J.L., Kirtley M., Nasr A.B. Levofloxacin rescues mice from lethal intranasal infections with virulent *Francisella tularensis* and induces immunity and production of protective antibody. *Vaccine*. 2008; 26(52):6874–82. DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.09.077.
- Sanapala S., Yu J.J., Murthy A.K., Li W., Guentzel M.N., Chambers J.P., Klose K.E., Arulanandam B.P. Perforin- and granzyme-mediated cytotoxic effector functions are essential for protection against *Francisella tularensis* following vaccination by the defined *F. tularensis* subsp. *novicida*   fopC vaccine strain. *Infect. Immun.* 2012; 80(6):2177–85. DOI: 10.1128/IAI.00036-12.
- 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.
- Crane D.D., Warner S.L., Bosio C.M. A novel role for plasmin-mediated degradation of opsonizing antibody in the evasion of host immunity by virulent, but not attenuated, *Francisella tularensis*. *J. Immunol.* 2009; 183(7):4593–600. DOI: 10.4049/jimmunol.0901655.
- Wayne Conlan J., Shen H., Kuolee R., Zhao X., Chen W. Aerosol-, but not intradermal-immunization with the live vaccine strain of *Francisella tularensis* protects mice against subsequent aerosol challenge with a highly virulent type A strain of the pathogen by an alpha  T cell- and interferon gamma- dependent mechanism. *Vaccine*. 2005; 23(19):2477–85. DOI: 10.1016/j.vaccine.2004.10.034.
- Lavine C.L., Clinton S.R., Angelova-Fischer I., Marion T.N., Bina X.R., Bina J.E., Whitt M.A., Miller M.A. Immunization with heat-killed *Francisella tularensis* LVS elicits protective antibody-mediated immunity. *Eur. J. Immunol.* 2007; 37(11):3007–20. DOI: 10.1002/eji.200737620.
- Rawool D.B., Bitsaktsis C., Li Y., Gosselin D.R., Lin Y., Kurkure N.V., Metzger D.W., Gosselin E.J. Utilization of Fc receptors as a mucosal vaccine strategy against an intracellular bacterium, *Francisella tularensis*. *J. Immunol.* 2008; 180(8):5548–57. DOI: 10.4049/jimmunol.180.8.5548.
- 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.
- Vega-Ramos J., Alari-Pahissa E., Valle J.D., Carrasco-Mar n E., Espl gu es E., Borr s M., Mart nez-A. C., Lauzurico 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.
- 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):62–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-62-69.

39. Amu S., Gjertsson 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.

40. 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(3):e33349. DOI: 10.1371/journal.pone.0033349.

41. Vascotto F., Le Roux D., Lankar D., Faure-André G., Vargas P., Guernonprez P., Lennon-Duménil A.M. Antigen presentation by B lymphocytes: how receptor signaling directs membrane trafficking. *Curr. Opin. Immunol.* 2007; 19(1):93–8. DOI: 10.1016/j.coi.2006.11.011.

42. Poquet Y., Kroca M., Halary F., Stenmark S., Peyrat M.A., Bonneville M., Fournié J.J., Sjöstedt A. Expansion of Vgamma9 Vdelta2 T cells is triggered by *Francisella tularensis*-derived phosphoantigens in tularemia but not after tularemia vaccination. *Infect. Immun.* 1998; 66(5):2107–14. DOI: 10.1128/IAI.66.5.2107-2114.1998.

43. Rowland C.A., Hartley M.G., Flick-Smith H., Laws T.R., Eyles J.E., Oyston P.C. Peripheral human $\gamma\delta$ T cells control growth of both avirulent and highly virulent strains of *Francisella tularensis* in vitro. *Microbes Infect.* 2012; 14(7-8):584–9. DOI: 10.1016/j.micinf.2012.02.001.

44. Meierovics A., Yankelevich W.J., Cowley S.C. MAIT cells are critical for optimal mucosal immune responses during in vivo pulmonary bacterial infection. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2013; 110(33):E3119–28. DOI: 10.1073/pnas.1302799110.

45. Meierovics A.I., Cowley S.C. MAIT cells promote inflammatory monocyte differentiation into dendritic cells during pulmonary intracellular infection. *J. Exp. Med.* 2016; 213(12):2793–809. DOI: 10.1084/jem.20160637.

46. Bar-On L., Cohen H., Elia U., Rotem S., Bercovich-Kinori A., Bar-Haim E., Chitlaru T., Cohen O. Protection of vaccinated mice against pneumonic tularemia is associated with an early memory sentinel-response in the lung. *Vaccine.* 2017; 35(50):7001–9. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.10.053.

47. Anderson R.V., Crane D.D., Bosio C.M. Long lived protection against pneumonic tularemia is correlated with cellular immunity in peripheral, not pulmonary, organs. *Vaccine.* 2010; 28(40):6562–72. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.07.072.

48. Kartseva A.S., Silkina M.V., Titareva G.M., Vakhrameeva G.M., Kombarova T.I., Mironova R.I., Pavlov V.M., Mokrievich A.N., Firstova V.V. [Effect of vaccination with strain of *Francisella tularensis* 15 NIEG and its derivatives on the generation and functional activity of memory T-cells in mice]. *Biotechnologiya* [Biotechnology]. 2022; 38(3):49–61. DOI: 10.56304/S0234275822030024.

49. Kartseva A.S., Silkina M.V., Titareva G.M., Kombarova T.I., Mironova R.I., Firstova V.V. [Evaluation of the long-term memory T cell in mice after immunization with a live tularemia vac-

cine]. *Meditsinskaya Immunologiya* [Medical Immunology (Russia)]. 2023; 25(3):673–8. DOI: 10.15789/1563-0625-EOT-2746.

50. Henao-Tamayo M.I., Ordway D.J., Irwin S.M., Shang S., Shanley C., Orme I.M. Phenotypic definition of effector and memory T-lymphocyte subsets in mice chronically infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Vaccine Immunol.* 2010; 17(4):618–25. DOI: 10.1128/CVI.00368-09.

51. Ericsson M., Sandström G., Sjöstedt A., Tärnvik A. Persistence of cell-mediated immunity and decline of humoral immunity to the intracellular bacterium *Francisella tularensis* 25 years after natural infection. *J. Infect. Dis.* 1994; 170(1):110–4. DOI: 10.1093/infdis/170.1.110.

52. Roberts L.M., Davies J.S., Sempowski G.D., Frelinger J.A. IFN- γ , but not IL-17A, is required for survival during secondary pulmonary *Francisella tularensis* live vaccine stain infection. *Vaccine.* 2014; 32(29):3595–603. DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.05.013.

53. Cowley S.C., Meierovics A.I., Frelinger J.A., Iwakura Y., Elkins K.L. Lung CD4-CD8- double-negative T cells are prominent producers of IL-17A and IFN- γ during primary respiratory murine infection with *Francisella tularensis* live vaccine strain. 2010; 184(10):5791–801. DOI: 10.4049/jimmunol.1000362.

54. Abel B., Tameris M., Mansoor N., Gelderbloem S., Hughes J., Abrahams D., Makhetha L., Erasmus M., de Kock M., van der Merwe L., Hawkridge A., Veldsman A., Hatherill M., Schirru G., Pau M.G., Hendriks J., Weverling G.J., Goudsmit J., Sizemore D., McClain J.B., Goetz M., Gearhart J., Mahomed H., Hussey G.D., Sadoff J.C., Hanekom W.A. The novel tuberculosis vaccine, AERAS-402, induces robust and polyfunctional CD4+ and CD8+ T cells in adults. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2010; 181(12):1407–17. DOI: 10.1164/rccm.200910-1484OC.

55. Seder R.A., Hill A.V. Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity. *Nature.* 2000; 406(6797):793–8. DOI: 10.1038/35021239.

Authors:

Kartseva A.S., Silkina M.V., Ivashchenko T.A., Romanenko Ya.O., Firstova V.V. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. 24, "Block A" Territory, Obolensk, urban district Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation. E-mail: info@obvolensk.org.

Sayapina L.V. Scientific Center on Expertise of Medical Application Products. Building 2, 8, Petrovsky Boulevard, Moscow, 127051, Russian Federation. E-mail: general@expmed.ru.

Об авторах:

Карцева А.С., Силкина М.В., Иващенко Т.А., Романенко Я.О., Фирстова В.В. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Российская Федерация, 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24. E-mail: info@obvolensk.org.

Саяпина Л.В. Научный центр экспертизы средств медицинского применения. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, 8, стр. 2. E-mail: general@expmed.ru.