

В.В.Фирстова, В.М.Павлов, Т.Б.Кравченко, Е.В.Зырина, А.И.Борзилов, И.А.Дятлов

## ИЗМЕНЕНИЕ ЭФФЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ Т-ЛИМФОЦИТОВ МЫШЕЙ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ ПРОТИВ ТУЛЯРЕМИИ, ПРИ СТИМУЛЯЦИИ *IN VITRO* ТУЛЯРИНОМ

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболensk

Показано, что тулярин содержит антигены, которые специфически взаимодействуют с антителами сывороток мышей, вакцинированных *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ. Кроме того, показано, что тулярин в реакциях *in vitro* специфически усиливает экспрессию рецептора CD69 на поверхности CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> субпопуляций Т-лимфоцитов, а также специфически усиливает синтез цитокинов ИФН- $\gamma$  и ФНО- $\alpha$  Т-хелперами (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> лимфоцитами), выделенных от мышей, иммунизированных против туляремии. Предлагается использовать тулярин в серологических исследованиях и реакциях *in vitro* для выявления постинфекционного или поствакцинального иммунитета к туляремии.

*Ключевые слова:* туляремия, поствакцинальный иммунитет, CD69, ИФН- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ .

V.V.Firstova, V.M.Pavlov, T.B.Kravchenko, E.V.Zyrina, A.I.Borzilov, I.A.Dyatlov

## Alteration of Effector Activity of T-Lymphocytes in Mice Immunized against Tularemia, Using *in vitro* Stimulation by Tularin

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk

It has been shown that tularin contains antigens that specifically interact with antibodies of sera of mice vaccinated with *F. tularensis* 15 NIEG (15<sup>th</sup> line of production, Research Institute of Epidemiology and Hygiene). Besides, it has been established that tularin specifically intensifies expression of CD69 receptor on the surface of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> subpopulations of T-lymphocytes, and specifically enhances synthesis of IFN- $\gamma$  and FNO- $\alpha$  cytokines by means of T-helpers (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> lymphocytes) isolated from mice, immunized against tularemia. Put forward is the proposition to use tularin in serological surveys and reactions *in vitro* for identification of postinfectious or postvaccinal immunity to tularemia.

*Key words:* tularemia, postvaccinal immunity, CD69, IFN- $\gamma$ , FNO- $\alpha$ .

Туляремия является зоонозной инфекцией, вызываемой бактериями *Francisella tularensis*. Для профилактики туляремии в России используется живая туляремийная вакцина 15 НИИЭГ. Иммунизация данной вакциной приводит к формированию у людей длительного протективного иммунитета, аналогичного постинфекционному. В формировании постинфекционного и поствакцинального противотуляремийного иммунитета ключевую роль играют Т-лимфоциты, включая CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки, формирующие в конечном итоге пул Т-клеток памяти. Т-лимфоциты памяти при повторном взаимодействии с антигенами возбудителя туляремии начинают активно пролиферировать, преобразовываясь в эффекторные клетки, активно продуцирующие такие цитокины, как ИФН- $\gamma$  и ФНО- $\alpha$  [7]. ИФН- $\gamma$  и ФНО- $\alpha$ , в свою очередь, подавляют способность бактерий *F. tularensis* выживать и размножаться в макрофагах [4, 6]. Таким образом, Т-клетки памяти являются ключевым элементом иммунной защиты организма от повторного заражения туляремией.

Проявление эффекторной активности клетками памяти в ответ на повторный контакт с антигенами возбудителя инфекции свидетельствует о наличии специфического иммунитета [5]. До последнего времени выявление противотуляремийного иммунитета у людей проводили с использованием серологических исследований и/или реакции гипер-

чувствительности замедленного типа с тулярином. Аллергическая проба с тулярином может вызывать побочные реакции [1]. Поэтому взамен аллергических реакций *in vivo* предпочтительно использовать тесты для оценки Т-клеточного звена противотуляремийного иммунитета *in vitro* – безопасные для организма. Существующий метод *in vitro* – реакция лейкоцитолита – с использованием тулярина позволяет оценить цитотоксическую активность общего пула эффекторных клеток. Для выявления активации CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> субпопуляций Т-лимфоцитов широко используются методы цитофлюориметрии. Специфическую активацию лимфоцитов *in vitro*, как правило, индуцируют с использованием изолированных антигенов или клеточных структур. Тулярин представляет собой инактивированную суспензию клеток *F. tularensis*, содержащую широкий спектр антигенов. В литературе отсутствуют данные об использовании тулярина *in vitro* в качестве специфического индуктора изменения эффекторной активности Т-клеток у мышей, иммунизированных живой туляремийной вакциной.

Цель исследования – оценить способность тулярина специфически активировать в системе *in vitro* CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> субпопуляции Т-лимфоцитов мышей, иммунизированных вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ, а также выявить наличие антител к тулярину в сыворотках иммунных мышей.

## Материалы и методы

**Штаммы.** В работе использовались штаммы *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ, *F. tularensis* 503; *Yersinia pestis* EV НИИЭГ; *Salmonella enteritidis* 92 из коллекции патогенных микроорганизмов ГНЦ ПМБ. Бактериальные культуры для иммунизации мышей выращивали: *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ, *F. tularensis* 503 – на FT агаре (ФБУН ГНЦ ПМБ) 16 ч при 37 °С; *Yersinia pestis* EV НИИЭГ – на агаре Brain heart infusion (High Media, India) с добавлением 5 % гемолизированной крови 16–18 ч при 28 °С; *Salmonella enteritidis* 92 – на ГРМ-агаре (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) 16 ч при 37 °С.

**Животные.** Мышей линии BALB/c весом 18–20 г иммунизировали однократно подкожно клетками *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ и *Salmonella enteritidis* 92 по 20 КОЕ (14 и 7 мышей в группах соответственно), *Y. pestis* EV НИИЭГ в дозе  $1 \cdot 10^5$  КОЕ (7 мышей в группе). На 28-е сутки после иммунизации у семи мышей из каждой группы, включая интактных в качестве отрицательного контроля, отбирали кровь для получения сывороток и селезенки для выделения спленоцитов.

**Заражение.** На 28-е сутки после иммунизации по 7 мышей заражали подкожно штаммом *F. tularensis* 503 ( $LD_{50}$  меньше 10 КОЕ): интактных – в дозе 10 КОЕ/мышь; иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ – в дозе 500 КОЕ/мышь ( $50 LD_{50}$ ). Наблюдение за зараженными животными проводили в течение 21 сут. Селезенки павших животных гомогенизировали и высевали на FT агар.

**Тулярин** (аллерген туляремийный жидкий для накожного применения) – коммерческий препарат, представляющий собой взвесь туляремийных микробов вакцинного штамма *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ, убитых нагреванием в 0,9 % растворе хлорида натрия (ФГУН «НПО «Микроген», Омск).

**Определение титра антител.** Тулярин в количестве  $10^8$  кл/мл адсорбировали в лунки 96-луночного планшета фирмы Costar (США) при 4 °С в течение ночи.

Свободные центры связывания блокировали 3 % раствором сухого обезжиренного молока при 37 °С в течение 30 мин. Сыворотки мышей исходно разводили 1:20, далее титровали с шагом 1:2 и инкубировали при 37 °С в течение 1 ч. После трехкратной отмывки добавляли конъюгат овечьих антител к иммуноглобулину мыши – пероксидаза хрена (Amersham) в рабочем разведении и инкубировали при 37 °С в течение 1 ч. Окрашивание проводили раствором субстрата для пероксидазы хрена ортофенилендиамина (ОФД) (Sigma, США) с добавлением перекиси водорода до 0,03 %. Реакцию останавливали раствором 0,1 М соляной кислоты. Оптическую плотность в лунках планшета определяли с помощью Multiscan («Labsystem», Финляндия) при длине волны 492 нм.

**Определение поверхностных маркеров лимфоцитов и внутриклеточных цитокинов.** Спленоциты

( $5 \cdot 10^5$  кл/мл) каждой группы мышей выделяли [8], пулировали и инкубировали в лунках 96-луночного планшета по 200 мкл 24 ч при 37 °С во влажной атмосфере с содержанием 5 %  $CO_2$  в присутствии тулярина ( $10^8$  м.к./мл) и без него. После инкубирования спленоциты отмывали в фосфатно-солевом буфере и обрабатывали моноклональными антителами к поверхностным маркерам CD3 PerCP (BD Biosciences Farmigen), CD4 APC, CD8 PE, CD69 FITC (Caltag, Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителей.

Для определения внутриклеточных цитокинов за 4 ч до внесения моноклональных антител в культуру спленоцитов добавляли пермеабиллизатор GolgiPlug (BD Bioscience). Затем добавляли моноклональные антитела к поверхностным рецепторам CD3 PerCP и CD4 APC. Через 15 мин добавляли 0,2 % раствор Твин-20 и моноклональные антитела IFN $\gamma$ -FITC и ФНО- $\alpha$ -PE (Caltag, Invitrogen) и инкубировали еще 20 мин.

Спленоциты анализировали на проточном цитофлюориметре FACSCalibur (Becton Dickinson). Для анализа выделяли (гейтировали) клетки с близкими физическими параметрами светорассеяния и интенсивностью флюоресценции. В каждом образце анализировали 10 тыс. клеток. Процент клеток, несущих маркер CD69, а также клетки, содержащие внутриклеточные цитокины ИФН- $\gamma$  и ФНО- $\alpha$ , определяли с помощью трехцветного цитометрического анализа в программе «Cell Quest».

**Статистика.** Достоверность различий определяли по t-критерию Стьюдента.

## Результаты и обсуждение

Формирование протективного противотуляремийного поствакцинального иммунитета у экспериментальных животных было подтверждено результатами экспериментальной инфекции после заражения штаммом *F. tularensis* 503: все зараженные мыши, иммунизированные *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ, оставались живыми до конца срока наблюдения, а все интактные – погибли на 4–6-й день после инфицирования.

Оценка гуморального иммунитета методом ИФА показала, что у мышей, иммунизированных *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ, титр антител составил в среднем 1:68 (таблица). Несмотря на 100 % выживаемость иммунных мышей, у одного животного из пяти проверенных титр антитела к тулярину был 1:20. У мышей, вакцинированных гетерологичными вакцинами *Salmonella enteritidis* 92 и *Yersinia pestis* EV НИИЭГ, антитела к тулярину в ИФА не обнаруживались, что свидетельствует о специфичности реакции с тулярином.

Возможность использования тулярина в качестве активатора Т-лимфоцитов оценивали по изменению экспрессии поверхностного рецептора CD69 – маркера ранней активации клеток. В таблице при-

Специфическая активность гуморального и клеточного противотуляремийного иммунитета у мышей линии BALB/c

Группы мышей (n=7)	Средние реципрокные титры антител к тулярину	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>			CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>		
		Условия культивирования		КС*	Условия культивирования		КС*
		без активации, среда RPMI, %	активация тулярином, %		без активации, среда RPMI, %	активация тулярином, %	
Интактные	20	0,46	0,77	1,67	2,91	3,78	1,30
Иммунизированные <i>F. tularensis</i> 15 линии НИИЭГ	68 (20÷160)	1,07	<b>8,94</b>	<b>8,36</b>	3,82	<b>7,65</b>	<b>2,00</b>
Иммунизированные <i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ	20	1,39	2,67	1,92	1,63	2,69	1,65
Иммунизированные <i>S. enteritidis</i> 92	20	2,64	2,78	1,05	8,58	9,36	1,09

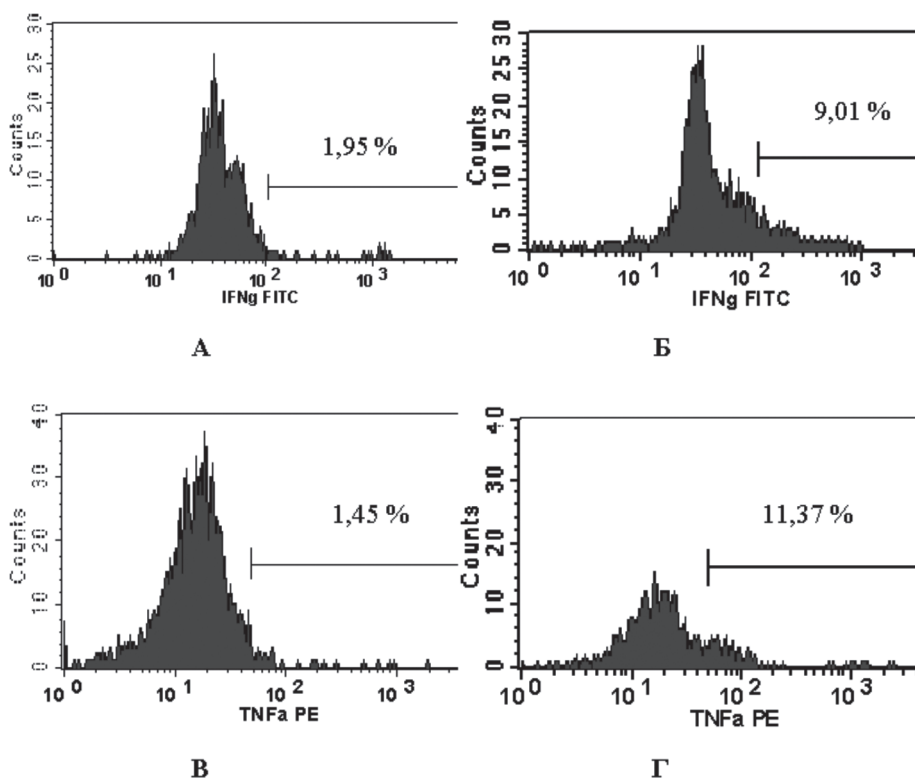
\*Коэффициент стимуляции – соотношение CD69<sup>+</sup> лимфоцитов, стимулированных *in vitro* тулярином, к количеству CD69<sup>+</sup> лимфоцитов, не стимулированных.

ведены данные процентного содержания Т-хелперов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) и Т-супрессоров (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), экспрессирующих маркер CD69, после стимуляции их *in vitro* тулярином в популяции лимфоцитов, полученных от интактных и иммунизированных мышей. Ранее было показано, что возбудители туляремии, чумы и сальмонеллеза имеют перекрестно реагирующие антигены [9]. Поскольку нами методом ИФА в сыворотках мышей, иммунизированных *Y. pestis* и *S. enteritidis*, не выявлено перекрестно реагирующих антител к тулярином, то для подтверждения специфичности экспрессии маркера ранней активации на Т-хелперах в ответ на стимуляцию их *in vitro* тулярином исследовались также лимфоциты, полученные от мышей, иммунизированных *Y. pestis* EV НИИЭГ и *S. enteritidis* 92 в иммуногенных дозах.

Без активации тулярином *in vitro* количество CD69-позитивных CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, выделенных

из селезенки мышей на 28-й день после иммунизации животных вакцинами штаммами *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ, *Y. pestis* EV НИИЭГ или *S. enteritidis* 92, составило 1,07, 1,39 и 2,64 % соответственно. Содержание CD69-позитивных CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов у интактных мышей составило 0,46 %. Некоторое увеличение содержания CD69<sup>+</sup> Т-хелперов у иммунных животных по сравнению с лимфоцитами, полученными от интактных мышей, свидетельствует о спонтанной поствакцинальной функциональной активности лимфоцитов.

Активация спленоцитов *in vitro* тулярином приводила к увеличению CD69-позитивных Т-хелперов только в группе мышей, иммунизированных живой туляремийной вакциной. Процент лимфоцитов с маркерами CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> в этой группе животных после стимуляции тулярином увеличился до 8,94 и коэффициент стимуляции (КС) соста-



Процентное содержание Т-хелперов, синтезирующих ИФН- $\gamma$  и ФНО- $\alpha$  без стимуляции и после стимуляции их *in vitro* тулярином, у мышей, иммунизированных *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ:

Процентное содержание CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> клеток, синтезирующих ИФН- $\gamma$  (А) и ФНО- $\alpha$  (Б) без стимуляции *in vitro* тулярином; процентное содержание CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> клеток, синтезирующих соответственно ИФН- $\gamma$  (Б) и ФНО- $\alpha$  (Г) после стимуляции *in vitro* тулярином

вил 8,36. В остальных группах мышей КС не превышал 1,92. Полученные данные свидетельствуют о специфичной активации тулярином Т-хелперов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>) мышей со сформированным иммунитетом к туляремии.

В субпопуляции цитотоксических лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) под влиянием тулярина *in vitro* тенденция к увеличению клеток, экспрессирующих маркер CD69, отмечалась только в группе мышей, иммунизированных против туляремии (КС = 2, таблица).

Достоверное по отношению к не активированным тулярином лимфоцитам увеличение Т-хелперов, синтезирующих ИФН-γ и ФНО-α, в ответ на стимуляцию антигенами туляремийного микроба *in vitro* обнаружено только у лимфоцитов, выделенных от мышей, иммунизированных *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ (рисунок). Содержание CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> лимфоцитов, синтезирующих ИФН-γ и ФНО-α, после активации их *in vitro* тулярином составляло 9,01 и 11,37, а без стимуляции – 1,95 и 1,45 % соответственно.

Таким образом, показано, что тулярин содержит антигены, которые специфически взаимодействуют с антителами сывороток мышей, вакцинированных *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ. Молекулярные структуры, содержащиеся в тулярине, специфически усиливают экспрессию CD69 Т-хелперами мышей линии BALB/c, иммунизированных против туляремии, в системе *in vitro*. Кроме того, нами показано, что тулярин специфически усиливает синтез ИФН-γ и ФНО-α лимфоцитами CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, что согласуется с данными, полученными в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) у людей, вакцинированных *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ или переболевших туляремией. В реакции ГЗТ происходит активация фагоцитов и Т-хелперов первого типа – Th1, приводящая к продукции ИФН-γ, ФНО-α и усилению экспрессии CD69 [6]. Поэтому предлагаемая нами реакция с тулярином *in vitro*, позволяющая выявить специфическую экспрессию рецептора CD69

на поверхности CD4<sup>+</sup> субпопуляции Т-лимфоцитов и усиление синтеза ИФН-γ и ФНО-α лимфоцитами CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, может быть использована для выявления постинфекционного или поствакцинального иммунитета к туляремии.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мейл Д., Бростофф Дж., Рот Д.Б., Роитт А. Иммунология. М.: Логосфера; 2007. 568 с.
2. Cowley S.C., Elkins K.L. Immunity to *Francisella*. Front. Microbiol. 2011; 2:1–26. doi:10.3389/fmicb.2011.00026.
3. Cowley S.C., Hamilton E., Frelinger J.A., Su J., Forman J., Elkins K.L. CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells control intracellular bacterial infections both *in vitro* and *in vivo*. J. Exp. Med. 2005; 202(2):309–19.
4. Elkins K.L., Colombini S.M., Meierovics A.I., Chu M.C., Chou A.Y., Cowley S.C. Survival of secondary lethal systemic *Francisella* LVS challenge depends largely on interferon gamma. Microbes Infect. 2010.12:28–36.
5. Elkins K.L., Cowley S.C., Bosio C.M. Innate and adaptive immunity to *Francisella*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2007; 1105:284–324.
6. Katkere B., Wilson J.E., Drake J.R. Effects of interferon-γ and *Francisella tularensis* elicited soluble factors on macrophage antigen processing. FASEB J. 2008; 22:1068.8.
7. Wenk M.R., Fernandis A.Z. A manual for biochemistry protocols. Vol. 3. National University of Singapore. 2007. 142 p.
8. Wickstrum J.R., Hong K.J., Bokhari S., Reed N., McWilliams N., Horvat R.T., Parmely M.J. Coactivating signals for the hepatic lymphocyte gamma interferon response to *Francisella tularensis*. Infect. Immun. 2007; 75:1335–42.
9. Yagz H., Uyanik M.H. et al. [Tularemia seroprevalence in the risky population living in both rural and urban areas of Erzurum]. Mikrobiyol. Bul. 2011; 45(1):67–74.

#### References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Male D., Brostoff J., Roth D., Roitt A. Immunology. Elsevier; 2006. 552 p.

#### Authors:

Firstova V.V., Pavlov V.M., Kravchenko T.B., Zyrina E.V., Borzilov A.I., Dyatlov I.A. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russia. E-mail: info@obolensk.org

#### Об авторах:

Фирстова В.В., Павлов В.М., Кравченко Т.Б., Зырина Е.В., Борзилов А.И., Дятлов И.А. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. 142279, Московская обл., п. Оболенск. E-mail: info@obolensk.org

Поступила 20.07.12.