

Специфические клеточные реакции, отражающие наличие поствакцинального противотуляремийного иммунитета

В.В.Фирстова, О.В.Калмантаева, А.А.Горбатов, Е.А.Тюрин

ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, Оболенск, Российская Федерация

Для профилактики туляремии используется живая туляремийная вакцина. В связи с реактогенностью препарата разработка более совершенной вакцины является актуальной задачей. В формировании иммунитета против туляремии ведущая роль отводится клеточному звену иммунитета. Тем не менее, защитные уровни клеточных реакций не установлены. В работе проведено сравнительное изучение реакций иммунных и наивных лимфоцитов на антигены *F. tularensis*. Показано, что в группе вакцинированных против туляремии людей специфически увеличиваются пролиферативная активность В-лимфоцитов, количество активированных Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺CD69⁺) и клеток памяти (CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺HLA-DR⁺). Данные параметры совместно с выявлением антител к ЛПС *F. tularensis* предлагается использовать для оценки противотуляремийного иммунитета.

Ключевые слова: туляремия, вакцина, иммунитет, лимфоциты, маркеры активации, пролиферация

Для цитирования: Фирстова В.В., Калмантаева О.В., Горбатов А.А., Тюрин Е.А. Специфические клеточные реакции, отражающие наличие поствакцинального противотуляремийного иммунитета. Бактериология. 2016; 1(1): 102–108. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-102-108

Specific cellular reactions reflected antitularemia postvaccinal immunity

V.V.Firstova, O.V.Kalmantaeva, A.A.Gorbatov, E.A.Turin

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation;

Live tularemia vaccine is used to prevent tularemia. Development of improved vaccine is an urgent task in connection with the reactogenicity of the live tularemia vaccine. Cell-mediated immunity to *F. tularensis* is a major component of the protective immune response. However, much remains to be clarified about protective level of cellular immune response. A comparative study of the reactions of immune and naive lymphocytes to antigens *F. tularensis* was done. Specific increase in proliferative activity of B-cells, number of activated T-helper cells (CD3⁺CD4⁺CD69⁺) and memory cells (CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺HLA-DR⁺) were found in vaccinated against tularemia donors. These parameters together with the detection of antibodies to LPS *F. tularensis* may correlates of immunity and protection against *F. tularensis*.

Key words: tularemia, vaccine, immunity, lymphocytes, activation markers, proliferation

For citation: Firstova V.V., Kalmantaeva O.V., Gorbatov A.A., Turin E.A. Specific cellular reactions reflected antitularemia postvaccinal immunity. Bacteriology. 2016; 1(1): 102–108. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-102-108

Антибактериальный иммунитет формируется с участием специфических антител, комплемента и за счет проявления функциональной активности определенными клеточными субпопуляциями. Иммунологическая эффективность вакцинации большинства коммерческих вакцин оценивается на основании выявления титров специфических антител. Для инфекций (туберкулез, туляремия, чума, бруцеллез и др.), иммунитет против которых обусловлен клеточ-

ными факторами, в первую очередь функциональной активностью Т-лимфоцитов, защитные уровни клеточных реакций не установлены.

Для формирования иммунных реакций необходимы сигналы для активации, пролиферации и дифференцировки Т- и В-лимфоцитов в эффекторные клетки и клетки памяти. Запуск иммунных реакций начинается с активации клеток. В качестве сигналов активации выступают биологические

Для корреспонденции:

Фирстова Виктория Валерьевна, доктор биологических наук, заведующая сектором иммунологии ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003
E-mail: firstova@obolensk.org

Статья поступила 06.06.2016 г., принята к печати 15.08.2016 г.

For correspondence:

Viectoria V. Firstova, Doctor of Science (biol.), Head of Immunology Sector, FBIS State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare

Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003
E-mail: firstova@obolensk.org

The article was received 06.06.2016, accepted for publication 15.08.2016

молекулы, которые определяют направленность пути иммунного ответа. При активации лимфоцитов на поверхности клеток появляются ко-стимулирующие молекулы и маркеры активации: CD69, CD80, CD86, CD28, CD25, HLA-DR, CD71 и т.д. [1]. Пролиферация лимфоцитов приводит к появлению большого количества специализированных Т- и В-клеток, способных обеспечивать формирование иммунитета. Длительность иммунитета, в том числе поствакцинального, обеспечивают клетки иммунологической памяти [2]. Отсутствие одного из сигналов приведет к снижению эффективности формирования иммунного ответа.

Для профилактики туляремии в России используют живую туляремийную вакцину, использование аналога которой за рубежом ограничено в связи с высокой реактогенностью [3]. Необходимость разработки более совершенной вакцины против туляремийной инфекции очевидна. Тем не менее, множество попыток создать менее реактогенную и протективную противотуляремийную вакцину не привело к успехам. Ряд сконструированных препаратов индуцировал активный синтез антител против антигенов *F. tularensis*, однако экспериментальные животные не были защищены от заражения туляремией [4]. Это связано с ключевой ролью клеточного иммунитета в защите от туляремийной инфекции и, в частности, Т-клетками памяти и их способностью запускать специфический иммунный ответ [5]. Вместе с тем, методы оценки клеточного противотуляремийного иммунитета не разработаны. Учитывая многофакторность клеточного иммунного ответа, его оценка должна проводиться на основании комплекса показателей.

Цель работы – выявить специфические клеточные реакции, отражающие наличие поствакцинального противотуляремийного иммунитета.

Материалы и методы

Доноры. В ходе выполнения работы была использована кровь 70 постоянно вакцинирующихся (на протяжении 20–25 лет) против туляремии людей и 20 непривитых доноров, которых использовали в качестве группы сравнения. Иммунизацию живой туляремийной вакциной (ГУП НПО «Микроген») проводили подкожным способом в плановом порядке и согласно приказу Минздрава России от 27.07.2001 №229 «О национальном календаре профилактических прививок по эпидемическим показаниям» и в полном соответствии с утвержденными инструкциями по применению вакцин. Забор крови осуществляли из локтевой вены доноров в объеме 10 мл. Получение сыворотки крови и гепаринизированной крови проводили общепринятыми методами. Лимфоцитарную массу выделяли методом центрифугирования в градиенте плотности Diacoll-1077 (Диа-М, Москва).

Кислото-нерастворимый комплекс *F. tularensis* (КНК) – белково-липополисахаридная фракция, полученная из осветленного лизата бактерий *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ в результате его закисления до pH 4,5. Препараты КНК предоставлены доктором биологических наук В.М.Павловым (отдел микробиологии чумы ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск).

Определение уровня антител к липополисахаридам (ЛПС) *F. tularensis*. Выявление специфического связывания ЛПС с антителами в сыворотках крови доноров проводили мето-

дом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА). ЛПС адсорбировали в концентрации 10 мкг/мл по 100 мкл в лунках 96-луночных плоскодонных полистирольных планшетов для ИФА. Результаты ИФА оценивали по оптической плотности окрашенного раствора на микропланшетном спектрофотометре «Униплан» («Пикон», Россия) при длине волны 450 нм.

Иммуноблоттинг проводили по методу Towbin H., et al. (1984) [6]. Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану Hybond C из геля после электрофореза осуществляли на полужидкостном электроблоттере в течение 1 ч при 200 мА в буферном растворе (pH 8,3) следующего состава: 0,025 М трис-HCl, 0,193 М глицина, 20% этанола. После этого мембрану отмывали 0,01 М фосфатным буфером (pH 7,2) и проводили иммуноанализ. Блокировку мембран осуществляли 5% обезжиренным молоком в 0,01 М фосфатно-солевом буфере (pH 7,2) 1 ч при 37°C. Мембраны инкубировали с тестируемыми сыворотками в разведении 1/100 1 ч при 37°C, затем добавляли пероксидазный конъюгат Anti-human IgG (whole molecule) (Sigma, США) в разведении 1 : 1000 и инкубировали 1 ч при 37°C. Результаты реакции визуализировали, добавив свежеприготовленный субстрат, содержащий 0,05% диаминобензидина и 0,015% перекиси водорода, 0,1 мг/мл хлорида никеля (NiCl₂) в 0,01 М фосфатно-солевом буфере (pH 7,2).

Определение пролиферативной активности лимфоцитов с использованием красителя сукцинимидилового эфира карбоксифлуоресцеина (CFSE). 50 × 10⁶ кл/мл лимфоцитов окрашивали 5 мкМ/мл CFSE (BD e-Bioscience, США) при температуре 37°C, в атмосфере 5% углекислого газа (CO₂) и 5% влажности в течение 10 мин. Затем клетки отмывали дважды центрифугированием в RPMI-1640, содержащей 10% фетальной сыворотки, осадок ресуспендировали в полной питательной среде до концентрации 1 × 10⁶ кл/мл. Инкубировали в лунках 96-луночного планшета по 200 мкл при температуре 37°C, во влажной атмосфере, содержащей 5% углекислый газ (CO₂) в присутствии 10 мкг/мл КНК *F. tularensis* или только в полной питательной среде в течение шести суток. Для анализа пролиферативной активности Т- и В-лимфоцитов окрашенные CFSE лимфоциты после активации КНК *in vitro* метили моноклональными антителами CD19-APC, CD3-FITC (Caltag Invitrogen, США).

Определение пролиферативной активности в реакции бласттрансформации лимфоцитов. Лимфоциты (2 × 10⁵ кл/мл) инкубировали с КНК в течение 48 ч при температуре 37°C в газовой среде с 5% углекислого газа (CO₂). В качестве неспецифического стимулятора Т-клеток использовали конканавалин А (Sigma, США) в концентрации 5–10 мкг/мл. Пролиферацию оценивали с помощью добавления [3H]-тимидина (1 мкКи/лунку, «Изотоп», Россия) и последующей 16-часовой инкубации. Включение [3H]-тимидина было определено на сцинтиляционном счетчике Rackbeta (LKB, Sollentuna, Швеция). Результаты представлены в виде индексов стимуляции, рассчитанных как отношение импульсов в минуту в присутствии КНК и без него.

Выявление маркеров активации лимфоцитов. Выявление маркеров CD69-FITC, CD28-PE, CD86-PE, HLA-DR-PE (Caltag Invitrogen, США) проводилось в цельной крови, культивируемой в течение 24 ч и 48 ч в полной питательной среде с КНК и без него, на поверхности CD19⁺, CD3⁺, CD3⁺CD4⁺,

CD3⁺CD8⁺ субпопуляций клеток, меченных моноклональными антителами CD3-PerCP, CD19-APC, CD4-APC, CD8-PE, CD45RO-FITC (Caltag Invitrogen, США). Цитофлуориметрический анализ проводили на проточном цитометре FACSCalibur, BD (США). Полученные данные обрабатывали в программе CellQuest Pro.

Статистический анализ. Обработку полученных данных проводили методами вариационной статистики при помощи программы Microsoft Excel 2007. Критерий Стьюдента применялся в работе для определения статистически значимых различий между средними значениями двух групп. Результаты экспериментов были представлены как средняя величина, стандартное отклонение (ошибка среднего) и достоверность различий между группами, с вычислением доверительного интервала (P), определяемого путем расчета критерия Стьюдента t с помощью программ статистической обработки данных, встроенных в программу Microsoft Excel 2007. Стандартные отклонения P менее чем 0,05 считали статистически достоверными.

Результаты и обсуждение

Выявление антител к антигенам *F. tularensis* в сыворотках крови вакцинированных против туляремии людей. Анализ специфического гуморального звена иммунитета показал, что у вакцинированных против туляремии доноров в 92% случаев в сыворотке крови выявлялись антитела к ЛПС (в титрах 1 : 400–1 : 5120) и к белкам *F. tularensis* различной молекулярной массы (рис. 1).

Анализ активации В-лимфоцитов под влиянием КНК *F. tularensis*. В-лимфоциты не только синтезируют антитела, но также способствуют активации Т-лимфоцитов за счет межрецепторных взаимодействий. При условии наличия иммунитета против проникшего патогена повторное проникновение антигена в организм приводит к стремительной активации лимфоцитов и экспрессии ко-рецепторов для межклеточных взаимодействий. Между группами вакцинированных против туляремии людей и не вакцинированных доноров была проведена сравнительная оценка влияния антигенов *F. tularensis* на способность В-лимфоцитов крови усиливать экспрессию маркера ранней активации CD69 и ко-стимулирующего рецептора CD86, необходимого для активации и индукции пролиферации CD4⁺Т-лимфоцитов.

В-лимфоциты (CD19⁺), полученные как от вакцинированных против туляремии людей, так и от не вакцинированных доноров, в течение первых 18 ч в присутствии КНК усиливали экспрессию CD69 маркера на поверхности клеток в 77% и 20% случаев соответственно (рис. 2). Аналогичные результаты наблюдали при анализе изменения экспрессии CD86

маркера на поверхности CD19⁺ лимфоцитов. В 20% случаев у не вакцинированных и в 60% случаев у иммунизированных туляремийной живой вакциной доноров наблюдалось усиление экспрессии CD86 рецептора на поверхности В-лимфоцитов под влиянием КНК (рис. 2). Наличие антител в сыворотке крови не всегда совпадало с появлением маркеров активации на поверхности В-лимфоцитов под влиянием КНК.

Оценка пролиферативной активности лимфоцитов. Усиление пролиферативной активности лимфоцитов в ответ на стимуляцию антигеном отражает способность лимфоцитов активироваться под влиянием данного антигена и увеличивать пул специфических лимфоцитов для борьбы с инфекционным патогеном. Данные реакции бласттрансформации показали, что индекс стимуляции лимфоцитов антигенами туляремийного микроба у постоянно прививаемых людей (на протяжении 20–25 лет) был повышен по сравнению с не-

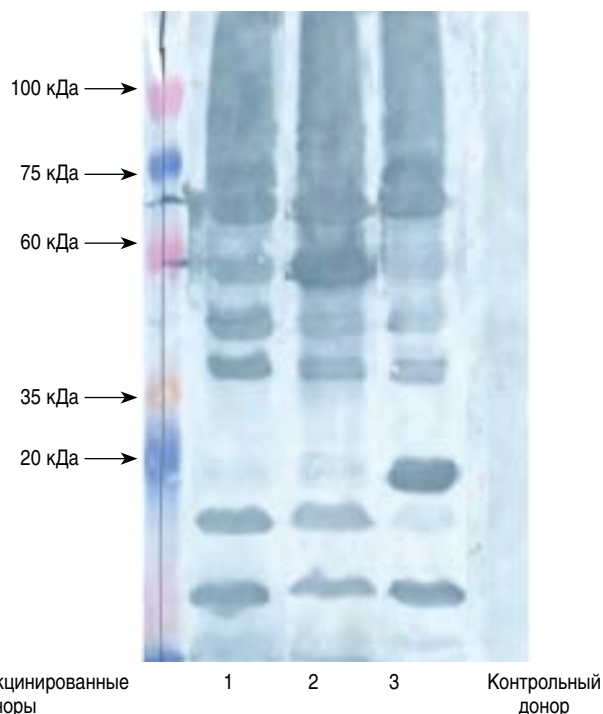
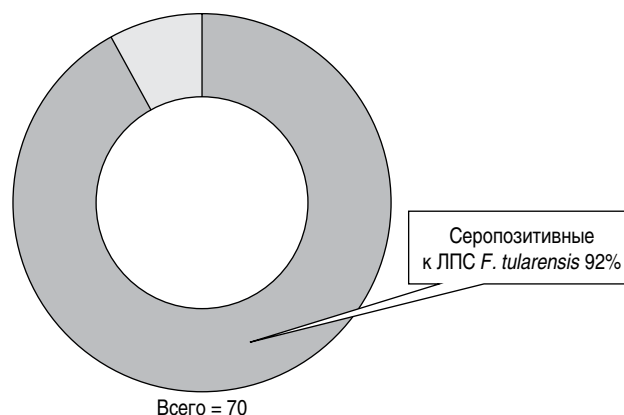


Рис. 1. Выявление антител к антигенам *F. tularensis* в сыворотках крови у иммунизированных живой туляремийной вакциной доноров. А – процент выявления антител в сыворотке крови к ЛПС *F. tularensis* 15/10; Б – иммуноблот сывороток доноров с ультразвуковым дезинтегратором *F. tularensis* 15/10.

Таблица 1. Индекс стимуляции лимфоцитов под влиянием антигенов *F. tularensis* 15 НИИЭГ в реакции бласттрансформации у невакцинированных и иммунизированных живой туляремийной вакциной доноров

Группа	Индекс стимуляции	
	до иммунизации	после иммунизации
Доноры, вакцинированные <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ	2,71 ± 1,33	3,59 ± 1,16
Не вакцинированные доноры	1,10 ± 0,11	–

иммунными донорами (табл. 1). После иммунизации живой туляремийной вакциной индекс стимуляции лимфоцитов у отдельных людей не превышал значения до иммунизации. Цитометрический анализ пролиферативной активности (табл. 2) с одновременным использованием CFSE-красителя и моноклональных антител против CD19 и CD3 молекул показал, что усиление пролиферации под влиянием КНК в группе иммунизированных людей наблюдалось в первую очередь за счет субпопуляции В-лимфоцитов, среднее процентное содержание которой в цельной крови составляет 12–15%, что может объяснять незначительное повышение индекса стимуляции лимфоцитов у доноров после вакцинации.

Анализ активации Т-лимфоцитов под влиянием КНК *F. tularensis*. Ключевую роль в формировании противотуляремийного иммунитета играют Т-лимфоциты. В условиях стимуляции *in vitro* КНК клеток крови, полученных от ранее не вакцинированных против туляремии людей (рис. 3), процент Т-лимфоцитов (и их субпопуляций CD4⁺ и CD8⁺), экспрессирующих CD69, не увеличивался по сравнению с показателями не стимулированных клеток и составил $1,02 \pm 0,42\%$ и $1,22 \pm 0,47\%$ соответственно. Под влиянием КНК *in vitro* в крови, полученной от вакцинированных доноров, специфически увеличивалось количество активированных Т-хелперов ($5,47 \pm 0,82\%$ CD3⁺CD4⁺CD69⁺). В крови, по-

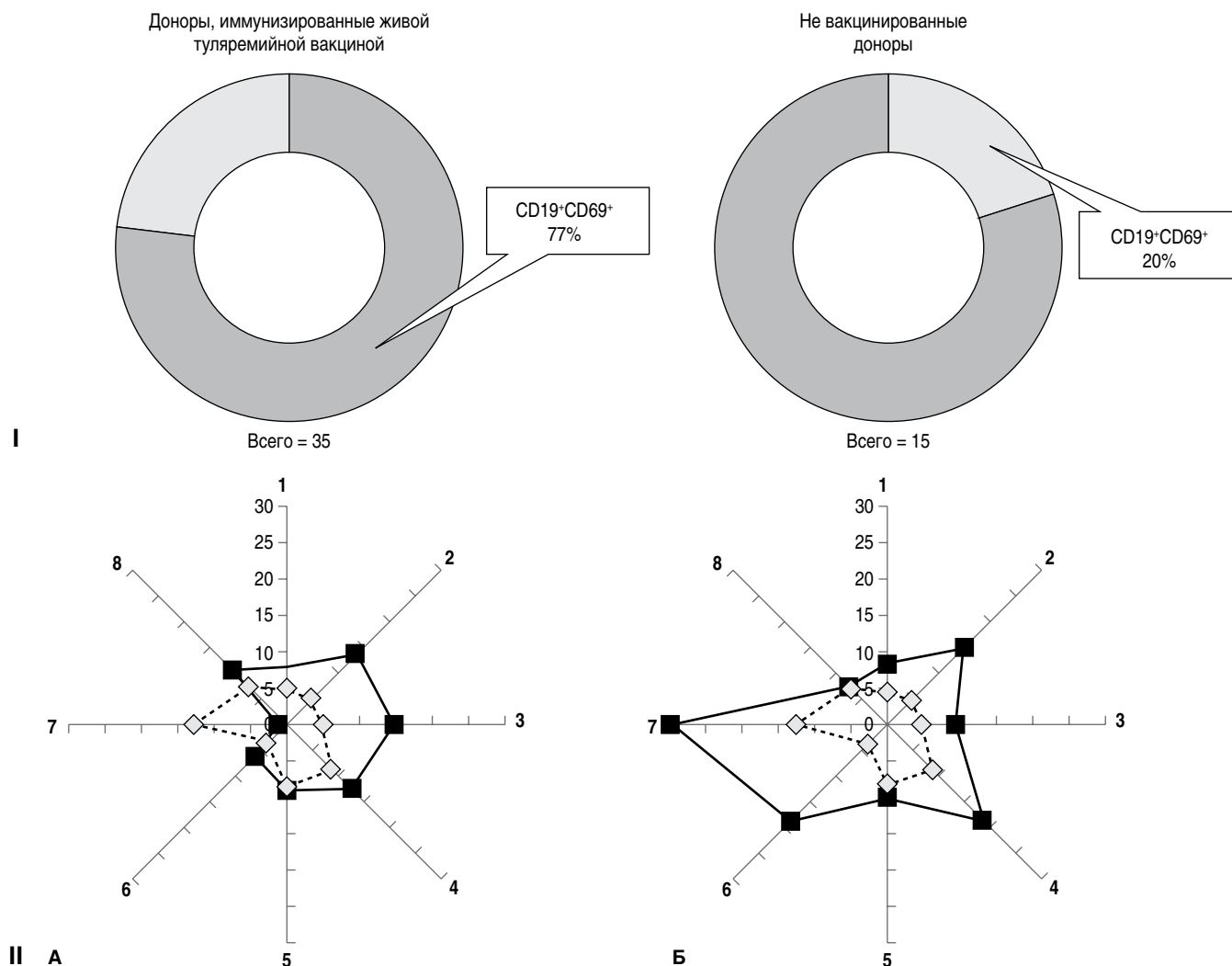


Рис. 2. Появление маркеров активации на В-лимфоцитах под влиянием КНК *F. tularensis* у невакцинированных и иммунизированных живой туляремийной вакциной доноров. I – процент CD19⁺ В-лимфоцитов, усиливающих экспрессию CD69 молекулы, под влиянием КНК. II – процент CD19⁺ В-лимфоцитов, усиливающих экспрессию CD86 молекулы, под влиянием КНК у контрольных (А) и иммунизированных живой туляремийной вакциной (Б) доноров после инкубирования клеток в течение 24 ч в среде (светлые маркеры) или в среде с КНК (темный маркер). Против делений оси 1 указаны проценты. На каждой оси двумя маркерами отображены индивидуальные данные, полученные от одного донора.

Таблица 2. Процентное содержание пролиферирующих Т- и В-лимфоцитов под влиянием антигенов *F. tularensis* у невакцинированных и иммунизированных живой туляремийной вакциной доноров

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

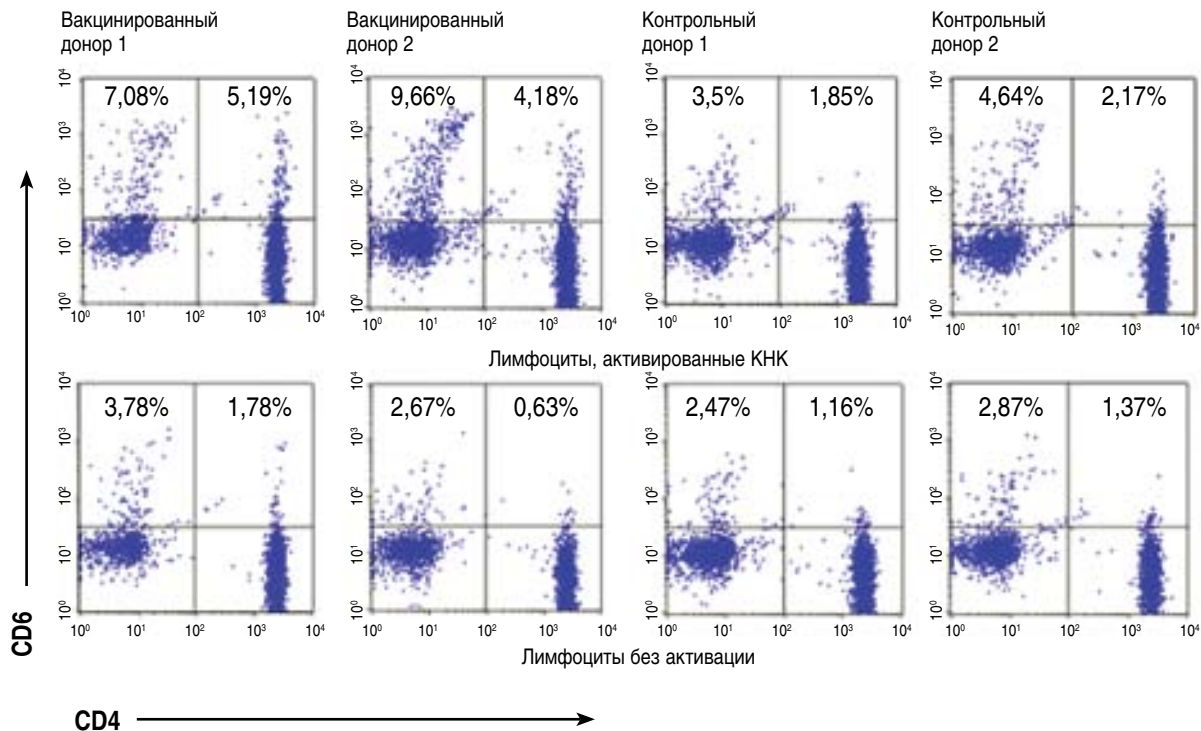


Рис. 3. Анализ активации Т-лимфоцитов под влиянием КНК *F. tularensis* у здоровых и иммунизированных живой туляремийной вакциной доноров. В верхней левой четверти гистограммы указан процент $CD3^+CD8^+CD69^+$ лимфоцитов, в правой – $CD3^+CD4^+CD69^+$ клеток.

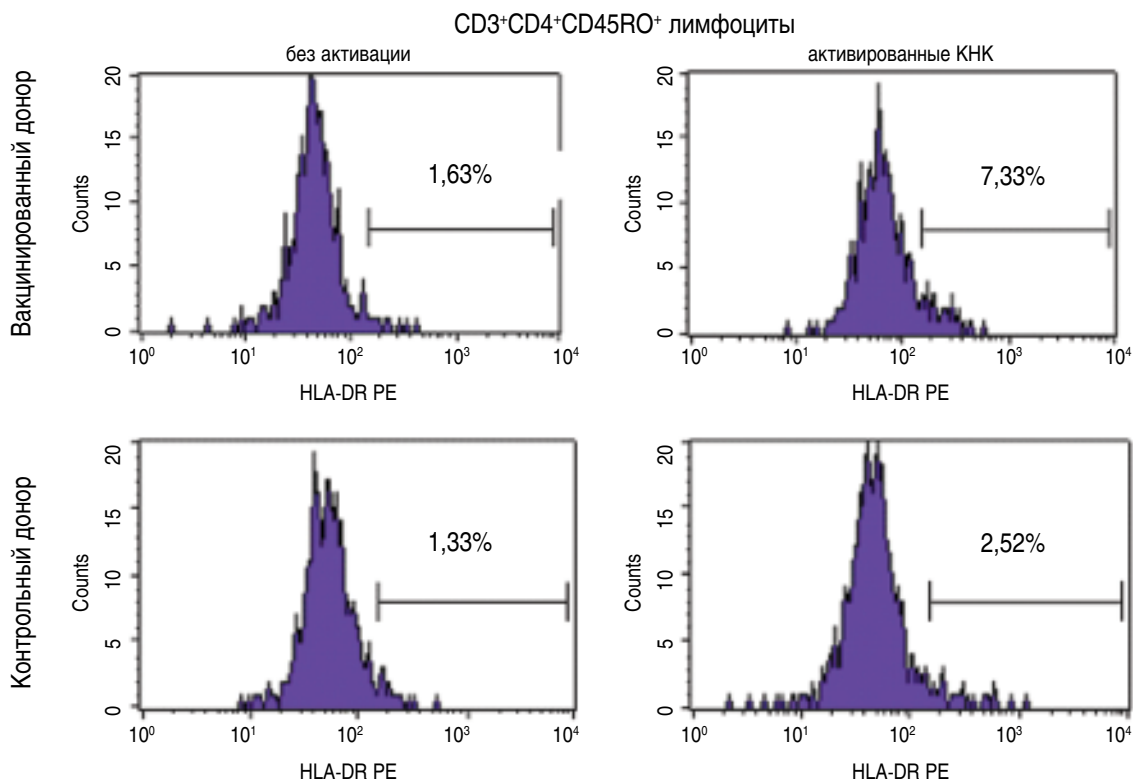


Рис. 4. Выявление специфических Т-лимфоцитов памяти $CD3^+CD4^+CD45RO^+$ у здоровых и иммунизированных живой туляремийной вакциной доноров. На гистограммах указан процент $CD3^+CD4^+CD45RO^+$ лимфоцитов, экспрессирующих активационную молекулу HLA-DR.

лученной от вакцинированных доноров, под влиянием КНК увеличивалось количество цитотоксических клеток, экспрессирующих CD69 молекулу, до $9,41 \pm 2,44\%$. Однако в 40% случаев в крови, полученной от невакцинированных доноров, количество CD3⁺CD8⁺CD69⁺ клеток под влиянием КНК также увеличивалось ($4,72 \pm 3,65\%$).

Выявление специфических Т-лимфоцитов памяти. Субпопуляции клеток памяти CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ являются минорными, и в крови здоровых доноров не превышают 1–2% [87]. У контрольных и вакцинированных доноров содержание CD45RO⁺HLA-DR⁺ субпопуляций CD3⁺-лимфоцитов после инкубирования клеток крови в питательной среде колебалось в пределах ($0,99 \pm 0,56\%$) (рис. 4). Через 48 ч активации клеток *in vitro* КНК в популяции лимфоцитов, полученных от вакцинированных, но не контрольных доноров, происходило увеличение CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺HLA-DR⁺ клеток ($8,04 \pm 0,34\%$).

Основным иммунодоминантным антигеном *F. tularensis*, к которому синтезируются специфические антитела после заболевания или вакцинации людей, является ЛПС туляремийного микроба [18]. Наши исследования показали, что после вакцинации против туляремии в 92% случаев выявляются антитела к ЛПС. Учитывая, что антигенная структура *F. tularensis* гетерогенна [119], мы проанализировали сыворотки в иммуноблот-анализе, который показал, что у доноров антитела синтезировались против полисахаридов и антигенов *F. tularensis* белковой природы.

Для формирования протективного противотуляремийного иммунитета необходимо синергичное участие клеточного и гуморального иммунитета [10]. Продукция специфических антител является одной из функций В-лимфоцитов. В процессе формирования иммунного ответа В-лимфоциты регулируют функциональную активность Т-лимфоцитов, выступая в роли предоставляющих антиген клеток, несущих на поверхности ко-стимулирующие молекулы [11], способствуя пролиферации и проявлению эффекторной функции Т-лимфоцитами. Усиление экспрессии молекулы ранней активации CD69 и ко-стимулирующей молекулы CD86 на поверхности В-лимфоцитов в присутствии КНК наблюдали как в группе вакцинированных против туляремии, так и в группе невакцинированных доноров. Поэтому выявление молекул CD69, CD86 на поверхности В-лимфоцитов, активированных КНК, не может быть использовано для выявления противотуляремийного иммунитета.

Учитывая ведущую роль Т-лимфоцитов в формировании протективного противотуляремийного иммунного ответа, мы сравнили способность к активации под влиянием КНК Т-клеток, полученных от иммунных и неиммунных доноров. Для формирования протективного иммунитета к возбудителю туляремии необходимо участие обеих субпопуляций Т-лимфоцитов CD4⁺ и CD8⁺. Косвенно об этом свидетельствует тот факт, что у дефицитных мышей по одной из субпопуляций снижается выживаемость после заражения вирусным штаммом *F. tularensis* [12, 13].

В связи с важностью обеих субпопуляций лимфоцитов в формировании иммунитета к туляремии мы оценили способность КНК активировать субпопуляции Т-хелперов и цитотоксических лимфоцитов. В результате было выявлено, что в группе вакцинированных против туляремии людей специфиче-

чески увеличивалось количество CD4⁺CD69⁺ Т-лимфоцитов под влиянием КНК. Цитотоксические лимфоциты также активировались под влиянием КНК, но не только в группе иммунизированных против туляремии людей, но также и в группе некоторых (40%) контрольных доноров. Об информативности показателей пролиферативной активности лимфоцитов и их способности усиливать экспрессию CD69 молекулы под влиянием КНК косвенно свидетельствуют наши предыдущие исследования на мышах, где было показано, что усиление пролиферативной активности и способность Т-лимфоцитов активироваться под влиянием антигенов *F. tularensis* у мышей, иммунизированных против туляремии, коррелируют с защитой животных от заражения туляремийной инфекцией [14].

В формировании постинфекционного и поствакцинального противотуляремийного иммунитета ключевую роль играют Т-лимфоциты памяти. Т-лимфоциты памяти отличаются от зрелых неиммунных Т-лимфоцитов по экспрессии ряда мембранных молекул. В частности, на клетках памяти экспрессируется значительное количество молекул CD45RO, которые ассоциированы с TCR и ко-рецепторами, что способствует существенному снижению (на два порядка и более) порога активации лимфоцита антигеном [15]. Т-лимфоциты памяти нуждаются в меньшей степени, чем зрелые неиммунные лимфоциты, в ко-стимулирующих воздействиях, и поэтому легче выходят в продуктивную эффекторную фазу иммунного ответа [16]. Активация этих клеток сопровождается экспрессией HLA-DR молекулы – маркера поздней активации клетки [17]. В клеточной культуре, полученной от вакцинированных против туляремии людей, в отличие от неиммунных доноров, под влиянием КНК *F. tularensis* отмечалось специфическое усиление экспрессии HLA-DR рецептора на поверхности Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺) памяти (CD45RO⁺). Способность клеток памяти активироваться под влиянием КНК свидетельствует о наличии циркулирующих в крови специфических лимфоцитов памяти, эффективно распознающих антигены *F. tularensis*.

Таким образом, результаты наших исследований показали, что реакции иммунных и наивных лимфоцитов на КНК *F. tularensis* различаются по некоторым параметрам активации. В частности, в группе вакцинированных против туляремии людей специфически увеличивались пролиферативная активность В-лимфоцитов, количество активированных Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺CD69⁺) и клеток памяти (CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺HLA-DR⁺). Эти параметры, по всей видимости, могут быть использованы для выявления клеточного противотуляремийного иммунитета. Совместный анализ данных гуморального и клеточного противотуляремийного иммунитета позволит проводить оценку иммунологической эффективности вакцинации.

Литература

1. Зурочка АВ, Хайдуков СВ, Кудрявцев ИВ, Черешнев ВА. Проточная цитометрия в медицине и биологии. Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2014.
2. Медуницын НВ, Миронов АН, Мовсесянц АА. Теория и практика вакцинологии: монография. М: ООО «Ремедиум», 2015.
3. Darling RG, Woods JB. USAMRIID's medical management of biological casualties handbook 5th ed. Fort Detrick. 2004.
4. Oyston PC, Quarry JE. Tularemia vaccine: past, present and future. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2005;87:277-81.

5. Sunagar R, Kumar S, Franz BJ, Gosselin EJ. Tularemia vaccine development: paralysis or progress? *Vaccine* (Auckl). 2016;6:9-23. Epub 2016 May 4.
6. Towbin H, Gordon J. Immunoblotting and dot immunoblotting: Current status and outlook. *J Immunol Methods*. 1984;72:313.
7. Chatterjee S, Clark CE, Lugli E, Roederer M, Nutman TB. Filarial Infection Modulates the Immune Response to Mycobacterium tuberculosis through Expansion of CD4+ IL-4 Memory T Cells. *J Immunol*. 2015;194(6):2706-14. doi: 10.4049/jimmunol.1402718.
8. Аронова НВ. Липополисахарид бактерий рода *Francisella* как иммунодоминантные антигены и их фазовые вариации в условиях *in vivo*: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07. Саратов, 2005.
9. Ellis J, Oyston PC, Green M, Titball RW. Tularemia. *Clinical Microbiol Rev*. 2002; 10:631-46.
10. Steiner DJ, Furuuya Y, Metzger DW. Host-pathogen interactions and immune evasion strategies in *Francisella tularensis* pathogenicity. *Infect Drug Resist*. 2014;7:239-51. doi: 10.2147/IDR.S53700.
11. O'Neill SK, Cao Y, Hamel KM, Doodes PD, Hutasa G, Finnegan A. Expression of CD80/86 on B cells is essential for autoreactive T cell activation and the development of arthritis. *J Immunol*. 2007;179:5109-16.
12. Bakshi CS, Malik M, Mahawar M, Kirimanjeshwara GS, Hazlett KR, Palmer LE, et al. An improved vaccine for prevention of respiratory tularemia caused by *Francisella tularensis* SchuS4 strain. *Vaccine*. 2008;26:5276-88.
13. Conlan JW, 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;23:2477-85.
14. Фирстова ВВ, Павлов ВМ, Горбатов АА, Комбарова ТИ, Караулов АВ, Дятлов ИА. Влияние степени воспаления у мышей линии balb/c, индуцированного разными дозами *F. tularensis* 15 НИИЭГ, на формирование антитуляремийного клеточного и гуморального иммунного ответа. *Иммунология*. 2014;35(3):147-50.
15. Хайтов РМ, Игнатъева ГА, Сидорович ИГ. *Иммунология*. М.: Медицина, 2000.
16. Xue J, Gao X, Fu C, Cong Z, Jiang H, Wang W, et al. Regulation of galectin-3-induced apoptosis of Jurkat cells by both O-glycans and N-glycans on CD45. *FEBS Lett*. 2013;587(24):3986-94. doi: 10.1016/j.febslet.2013.10.034.
17. Литвинова ЛС, Гуцол АА, Сохоневич НА, Кофанова КА, Хазиахматова ОГ, Шуплецова ВВ, и др. Основные поверхностные маркеры функциональной активности Т-лимфоцитов. *Медицинская иммунология*. 2014;16(1):7-26.
9. Ellis J, Oyston PC, Green M, Titball RW. Tularemia. *Clinical Microbiol Rev*. 2002;10:631-46.
10. Steiner DJ, Furuuya Y, Metzger DW. Host-pathogen interactions and immune evasion strategies in *Francisella tularensis* pathogenicity. *Infect Drug Resist*. 2014;7:239-51. doi: 10.2147/IDR.S53700.
11. O'Neill SK, Cao Y, Hamel KM, Doodes PD, Hutasa G, Finnegan A. Expression of CD80/86 on B cells is essential for autoreactive T cell activation and the development of arthritis. *J Immunol*. 2007;179:5109-16.
12. Bakshi CS, Malik M, Mahawar M, Kirimanjeshwara GS, Hazlett KR, Palmer LE, et al. An improved vaccine for prevention of respiratory tularemia caused by *Francisella tularensis* SchuS4 strain. *Vaccine*. 2008;26:5276-88.
13. Conlan JW, 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;23:2477-85.
14. Firstova VV, Pavlov VM, Gorbатов AA, Kombarova TI, Karaulov AV, Dyatlov IA. The formation of cell articulating and humoral immune response induced it mice f tularensis 15 niieg. *Immunologiya* 2014;35(3):147-50. (In Russian).
15. Khaitov RM, Ignat'eva GA, Sidorovich IG. *Immunology*. Moscow: "Meditcina" Publ., 2000. (In Russian).
16. Xue J, Gao X, Fu C, Cong Z, Jiang H, Wang W, et al. Regulation of galectin-3-induced apoptosis of Jurkat cells by both O-glycans and N-glycans on CD45. *FEBS Lett*. 2013;587(24):3986-94. doi: 10.1016/j.febslet.2013.10.034.
17. Litvinova LS, Gutsol AA, Sokhnevich NA, Kofanova KA, Khaziakhmatova OG, Shupletsova VV, et al. Basic surface markers of functional activity T-lymphocytes. *Medical Immunology*. 2014;16(1):7-26. (In Russian).

Информация о соавторах:

Калмантаева Ольга Валериевна, научный сотрудник сектора инфекционной иммунологии отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПИМБ
 Телефон: (4967) 36-0003

Горбатов Алексей Александрович, младший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПИМБ
 Телефон: (4967) 36-0003

Тюрин Евгений Александрович, кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией биологической безопасности ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПИМБ
 Телефон: (4967) 36-0003

Information about co-authors:

Olga V. Kalmantaeva, researcher, Infectious Immunology Sector, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, FBIS State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare
 Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
 Phone: (4967) 36-00-03

Aleksey A. Gorbатов, junior researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, FBIS State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare
 Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
 Phone: (4967) 36-00-03

Eugene A. Tyurin, PhD (med.), Chief of the Laboratory of Biological Safety, FBIS State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare
 Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
 Phone: (4967) 36-00-03

References

1. Zurochka AV, Khaidukov SV, Kudryavtsev IV, Chereshnev VA. *Protochnaya tsitometriya v meditsine i biologii*. Ekaterinburg, 2014. (In Russian).
2. Medunitsyn NV, Mironov AN, Movsesyants AA. *Teoriya i praktika vaktsinologii: monografiya*. Moscow: Remedium Publ., 2015. (In Russian).
3. Darling RG, Woods JB. *USAMRIID's medical management of biological casualties handbook* 5th ed. Fort Detrick. 2004.
4. Oyston PC, Quarry JE. Tularemia vaccine: past, present and future. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2005;87:277-81.
5. Sunagar R, Kumar S, Franz BJ, Gosselin EJ. Tularemia vaccine development: paralysis or progress? *Vaccine* (Auckl). 2016;6:9-23. Epub 2016 May 4.
6. Towbin H, Gordon J. Immunoblotting and dot immunoblotting: Current status and outlook. *J Immunol Methods*. 1984;72:313.
7. Chatterjee S, Clark CE, Lugli E, Roederer M, Nutman TB. Filarial Infection Modulates the Immune Response to Mycobacterium tuberculosis through Expansion of CD4+ IL-4 Memory T Cells. *J Immunol*. 2015;194(6):2706-14. doi: 10.4049/jimmunol.1402718.
8. Aronova NV. *Lipopolisakharid bakterii roda Francisella kak immunodominantnye antigeny i ikh fazovye variatsii v usloviyakh in vivo*. Dissertation. Saratov, 2005. (In Russian).