

## Оценка специфического гуморального и клеточного иммунитета у людей, периодически вакцинирующихся против чумы

В.В.Фирстова<sup>2</sup>, О.В. Калмантаева<sup>1</sup>, А.А. Горбатов<sup>1</sup>, Т.Б. Кравченко<sup>1</sup>, Е.А.Тюрин<sup>1</sup>, Н.Л. Бондаренко<sup>2</sup>, И.А. Дятлов<sup>1</sup>, А.В. Караулов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФБУН ГНЦ Прикладной микробиологии и биотехнологии, Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Оболensk, Россия

<sup>2</sup> ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия

## Specific humoral and cellular immunity in human periodically vaccinated against plague

V.V. Firstova<sup>1</sup>, O.V. Kalmantaeva<sup>1</sup>, A.A. Gorbатов<sup>1</sup>, T.B. Kravchenko<sup>1</sup>, E.A. Tjurin<sup>1</sup>, N.L. Bondarenko<sup>2</sup>, I.A. Dyatlov<sup>1</sup>, A.V. Karaulov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Federal State Institution of Science State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology, Obolensk, Russia

<sup>2</sup> I.M.Sechenov First Moscow State Medical University of Russian Ministry of Health, Moscow, Russia

### Аннотация

В работе приведены данные гуморального и клеточного противочумного иммунитета у людей периодически иммунизирующихся живой чумной вакциной. Титры антител к F1 антигену у людей, периодически вакцинирующихся против чумы на протяжении более 20 лет, были низкими и не у всех увеличивались после очередной вакцинации. Проанализированы изменения маркеров активации лимфоцитов в ответ на стимуляцию клеток F1 антигеном. Показано, что у людей, вакцинированных против чумы, под влиянием F1 антигена, происходит специфическое усиление экспрессии HLA-DR маркера на поверхности Т-лимфоцитов памяти.

### Ключевые слова

чума, *Y. pestis*, вакцинация, противочумный иммунитет, цитометрия, лимфоциты, антитела

Решающим критерием профилактической ценности вакцин у людей является их эпидемиологическая эффективность, которую определяют путем анализа снижения уровня заболеваемости среди вакцинированного населения. Оценка эффективности вакцинации против чумы затруднена в связи с тем, что в последние годы отмечаются лишь споради-

### Summary

The paper presents specific humoral and cellular immunity in people periodically vaccinated with live plague vaccine. Antibody titers to F1 antigen in human subjects vaccinated periodically (for more than 20 years) against plague, were low and increased not in all cases after the next vaccination. Changes in lymphocyte activation markers in response to the F1 antigen were analyzed. We found that memory T-lymphocytes specifically increase HLA-DR expression marker on their surface under the influence of the F1 antigen in blood of donors vaccinated against plague.

### Keywords

plague, *Y. pestis*, vaccination, antiplague immunity, cytometry, lymphocytes, antibodies

ческие случаи заболевания этой инфекцией. До настоящего времени косвенную оценку эффективности иммунизации живой чумной вакциной проводят путем определения поствакцинальных титров антител к F1 [1, 2]. Тем не менее, в ряде работ показано отсутствие корреляции между уровнем антител и антиинфекционной резистентностью [3].

Точно не известно, какому из многочисленных антигенов чумного микроба принадлежит решающая роль в иммуногенезе [4, 5, 6]. Протективные свойства известных специфических антител выражены относительно слабо. Об этом свидетельствует ряд неудачных попыток серопрофилактики и серотерапии чумы, и отсутствие влияния циклофосфана на уровень приобретенного иммунитета у лабораторных и диких грызунов [7]. Наличие противочумного гуморального иммунитета, обусловленное антителами к F1 антигену, сообщает защиту от гибели лишь части животным при заражении чумой [8]. Имеются примеры формирования напряженного клеточного иммунитета у вакцинированных против чумы людей, достаточного для защиты от заражения чумой даже при отсутствии антител к F1 антигену *Y. pestis* [9, 10]. Это свидетельствует о том, что для формирования противочумного протективного иммунитета необходимо формирование специфического клеточного иммунитета.

Оценка противочумного клеточного иммунитета затруднена. В 50-х годах XX века выявление клеточного противочумного иммунитета было предложено оценивать в кожных тестах с пестином [11, 12]. Пестин вызывал формирование специфической аллергической реакции, проявляющейся в виде покраснения участка кожи в месте введения пестина. В ряде случаев введение аллергена в организм человека приводило к нежелательным побочным реакциям организма [13]. Поэтому был предпринят ряд попыток разработать метод *in vitro*, позволяющий оценивать клеточный противочумный иммунитет: по изменению реакции бласттрансформации лимфоцитов [14], цитотоксической активности лимфоцитов [15, 16], изменения фенотипа клеток [17], активности синтеза ИФН- $\gamma$  лимфоцитами [18] в ответ на рестимуляцию антигенами чумного микроба. Однако до сих пор метод оценки клеточного противочумного иммунитета, который бы четко коррелировал с антиинфекционной резистентностью к возбудителю чумы не предложен.

Цель работы – выявить специфические показатели, отражающие наличие противочумного гуморального и клеточного иммунитета у людей, периодически иммунизирующихся живой чумной вакциной.

### Материалы и методы исследования

*Объект исследования.* Доноры, периодически вакцинирующиеся *Y. pestis* EV линии НИИЭГ. Кровь забирали на исследование через один

месяц после очередной иммунизации живой чумной вакциной. В качестве контроля использовали кровь людей, неработающих с *Y. pestis* и его антигенами, не болевших чумой и не вакцинированных против чумы.

*Определение титров антител к F1 антигену* проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА). F1 антиген сорбировали на планшеты в течение 1 ч при 37°C в 0,1 М карбонатном буфере, pH 9,6. После каждого этапа планшеты промывали 10 мМ трис-буфером, содержащим 0,15 М NaCl и 0,05 % твина-20, pH 7,2. Начиная с разведения 1 : 100, антитела разводили с шагом в 2 раза. Продолжительность инкубации с рабочими растворами на всех этапах составляла 1 ч при 37°C. Конъюгаты античеловеческих антител с пероксидазой хрена разводили 1 : 10 000 в конечной концентрации. В качестве субстрата использовали ортофенилендиамин, ферментативную реакцию останавливали через 15 мин 1 М раствором серной кислоты и определяли оптическую плотность растворов в лунках при 450 нм. Результаты ИФА оценивали на микропланшетном спектрофотометре «Униплан» («Пикон», Россия) При измерении использовали функцию автоматического вычитания фона.

*Стимуляция клеток крови.* Цельную кровь инкубировали в лунках 96-луночного планшета в трех повторах по 200 мкл при 37 °С, во влажной атмосфере, 5% CO<sub>2</sub> в присутствии 10 мкг/мл антигена F1 *Y. pestis* или в полной питательной среде RPMI в течение 4 ч – для оценки CD107b маркера, 24 ч – для выявления CD69 рецептора и 48 ч – для анализа экспрессии HLA-DR. По окончании инкубирования клетки крови окрашивали моноклональными антителами к поверхностным маркерам человека: CD3, CD4 APC, CD8 PE, CD69, HLA-DR, CD107b (Caltag, Invitrogen), мечеными флюорохромами FITC, PE, PerCP, PerCP-Cy5.5 или APC, в соответствии с Инструкцией производителя. Вкратце, к 100 мкл анализируемой клеточной взвеси добавляли по 1 мкл моноклональных антител. Инкубировали 30 мин при 4°C. Добавляли 2 мл холодного отмывочного буфера и центрифугировали при 400 g 5 мин. Сливали супернатант и ресуспендировали клетки в 200 мкл фосфатно-солевого буфера и 200 мкл 1% формальдегида для фиксации. Цитометрический анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur, BD (США) с использованием программы «Cell QuestPro». Оценивали 15000 событий. Сравнивали влияние F1 антигена на изменение количества анализиру-

емых субпопуляций клеток в группах контрольных и иммунизированных доноров.

**Статистический анализ.** Обработку полученных данных проводили методами вариационной статистики при помощи программы Microsoft Excel 2007. Стандартные отклонения Р менее чем 0,5 считали статистически достоверными.

### Результаты исследования и их обсуждение

Анализ уровня антител к F1 антигену в крови контрольных доноров показал, что у четверых из двенадцати человек выявляли антитела к F1 антигену чумного микроба в титрах от 1 : 100 до 1 : 400. Возможно, это связано с наличием перекрёстной реакции F1 с бактериями семейства *Yersinia*. Уровень антител к F1 антигену *Y. pestis* в сыворотках крови людей через месяц после иммунизации живой чумной вакциной, колебался в пределах 1 : 100–1 : 1600 (рис. 1).

У постоянно прививающихся против чумы людей (20 лет и более) антитела к F1 антигену через 1 год после последней вакцинации обнаруживали в титрах 1 : 100–1 : 400, либо не выявляли. Последующая ревакцинация не всегда приводила к усилению титров антител в сыворотке крови против F1 антигена *Y. pestis*.

Таким образом, можно заключить, что у первично вакцинируемых против чумы людей перед иммунизацией необходимо определять уровень антител к F1 антигену, чтобы исключить ложно-

положительные результаты. У постоянно прививающихся против чумы людей титры антител F1 антигену *Y. pestis* могут быть низкими.

Учитывая, что при чуме важную роль в формировании протективного иммунитета отводится клеточным реакциям мы попытались выявить специфические маркеры активации Т-лимфоцитов, появляющиеся под влиянием F1 антигена. Мы проанализировали изменение экспрессии CD69, CD107 рецепторов под влиянием F1 антигена на поверхности Т-хелперов и цитотоксических лимфоцитов, HLA-DR рецептора на поверхности лимфоцитов памяти CD45RO+, полученных от контрольных и иммунных доноров.

Инкубация клеток крови доноров в полной питательной среде в течение 24 ч при физиологических условиях не приводила к увеличению экспрессии CD69 рецептора на поверхности CD3+CD4+ и CD3+CD8+лимфоцитов ((1,12 ± 0,64) % и (1,52 ± 0,48) %, соответственно) по сравнению с содержанием этих субпопуляций лимфоцитов в цельной крови ((1,24 ± 0,33) % и (1,32 ± 0,92) %, соответственно), что свидетельствует об отсутствии активации клеток (рис. 2). Добавление в среду антигена F1 вызывало увеличение пула CD3+CD4+CD69+ лимфоцитов в культурах клеток, полученных как от вакцинированных против чумы людей ((6,92 ± 0,91) %), так и от некоторых контрольных доноров ((3,48 ± 2,58) %). У 8-ми из 12-ти контрольных доноров Т-хелперы усиливали экспрессию CD69

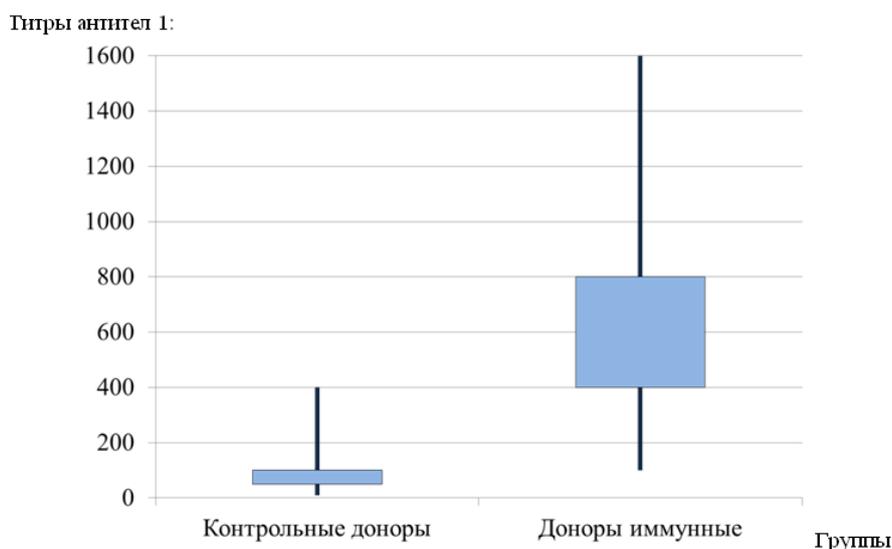


Рис. 1. Уровень антител к F1 в сыворотках крови доноров

рецептора на своей поверхности под влиянием F1 антигена.

Добавление в среду F1 антигена приводило к достоверному увеличению клеток, экспрессирующих CD69 рецепторную молекулу, в субпопуляции цитотоксических лимфоцитов, полученных от вакцинированных против чумы или контрольных доноров ( $(9,26 \pm 2,09) \%$  и  $(8,25 \pm 3,54) \%$ , соответственно) по сравнению с этими же клетками, инкубированными в среде без антигена.

Таким образом, мы выявили, что F1 антиген неспецифически индуцирует усиление экспрессии CD69 маркера на поверхности Т-хелперов и цитотоксических лимфоцитов.

CD8+ Т-лимфоциты могут уничтожать бактерии *Y. pestis* за счет проявления цитотоксических реакций [19]. Усиление цитотоксической активности коррелирует с появлением CD107 молекулы на поверхности Т-лимфоцитов [20]. Мы оценили влияние антигенов чумного микроба на изменение активности цитотоксических лимфоцитов, сравнив количество CD3+CD8+ клеток, экспрессирующих CD107b рецептор, после культивирования их в течение 4 ч в полной питательной среде без антигенов и с F1 антигеном *Y. pestis*. Как видно из рис. 3 достоверных изменений в содержании CD3+CD8+CD107b+ субпопуляции клеток под влиянием F1 антигена чумного микроба в данных условиях не выявили.

Большое значение в стремительном формировании иммунного ответа при повторном про-

никновении патогена играют клетки памяти. Для оценки специфической активации клеток памяти под влиянием антигена F1 мы анализировали увеличение количества HLA-DR-позитивных субпопуляций CD4+CD45RO+ и CD8+CD45RO+ Т-лимфоцитов, полученных от вакцинированных против чумы людей и контрольных доноров, под влиянием F1 антигена *Y. pestis*.

В крови у доноров, вакцинированных живой чумной вакциной, через 1 месяц после вакцинации содержание субпопуляций CD3+CD45RO+HLA-DR+, CD3+CD4+CD45RO+HLA-DR+ и CD3+CD8+CD45RO+HLA-DR+ статистически достоверно не отличалось от значений контроля. У невакцинированных и иммунизированных живой чумной вакциной доноров содержание CD45RO+HLA-DR+ субпопуляций Т-лимфоцитов после инкубации клеток крови в питательной среде в течение 48 ч составляло не более 4 % (табл. 1).

Инкубация клеток крови, полученной от невакцинированных доноров в присутствии F1 антигена *Y. pestis*, не приводила к усилению экспрессии HLA-DR рецептора на поверхности клеток памяти Т-лимфоцитов (табл. 1). В крови, полученной от вакцинированных живой чумной вакциной доноров, в присутствии F1 антигена *Y. pestis* происходило увеличение экспрессии HLA-DR рецептора на поверхности CD3+CD45RO+ клеток, процентное содержание которых составило  $(9,86 \pm 3,08) \%$  (табл. 1).

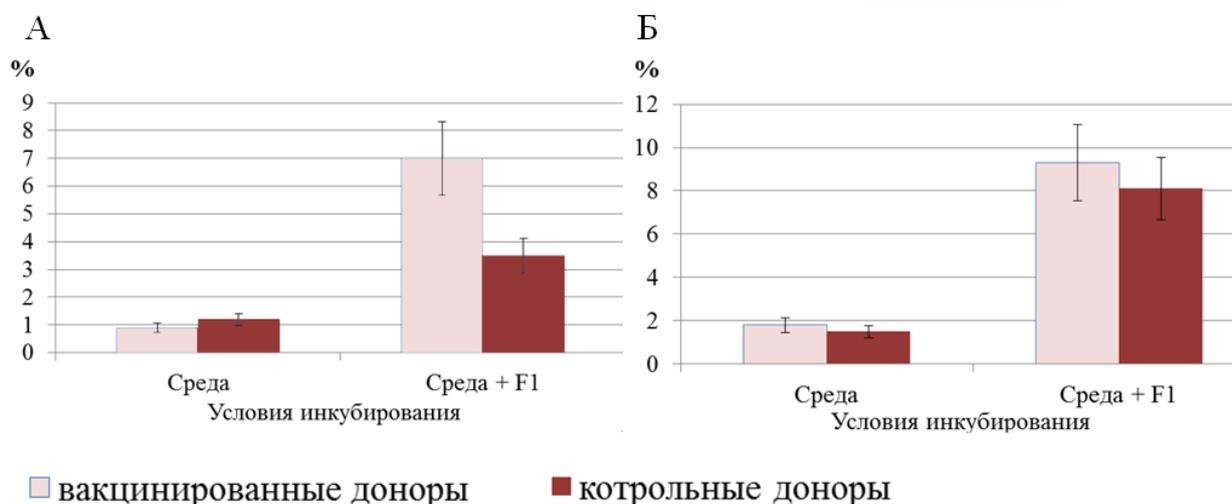


Рис. 2. Изменение экспрессии раннего маркера активации CD69 на поверхности Т-хелперов (А) цитотоксических лимфоцитов (Б), полученных от вакцинированных против чумы и контрольных доноров, под влиянием F1 антигена *Y. pestis*

Анализ субпопуляций Т-лимфоцитов показал, что маркер поздней активации HLA-DR, под влиянием F1 антигена *Y. pestis* появляется и на поверхности CD45RO+ Т-хелперов и на поверхности CD45RO+ цитотоксических лимфоцитов, полученных от людей, иммунизированных живой чумной вакциной, но не от контрольных доноров (табл. 1).

У двоих из 30-ти вакцинированных доноров на поверхности субпопуляций Т-лимфоцитов памяти (CD3+CD45RO+HLA-DR+, CD3+CD4+CD45RO+HLA-DR+ и CD3+CD8+CD45RO+HLA-DR+) отмечали значительное усиление экспрессии HLA-DR рецептора (65,7; 63,02; 41,21 % и 72,34; 73,56 и 75,44 %, соответственно) (рис. 4).

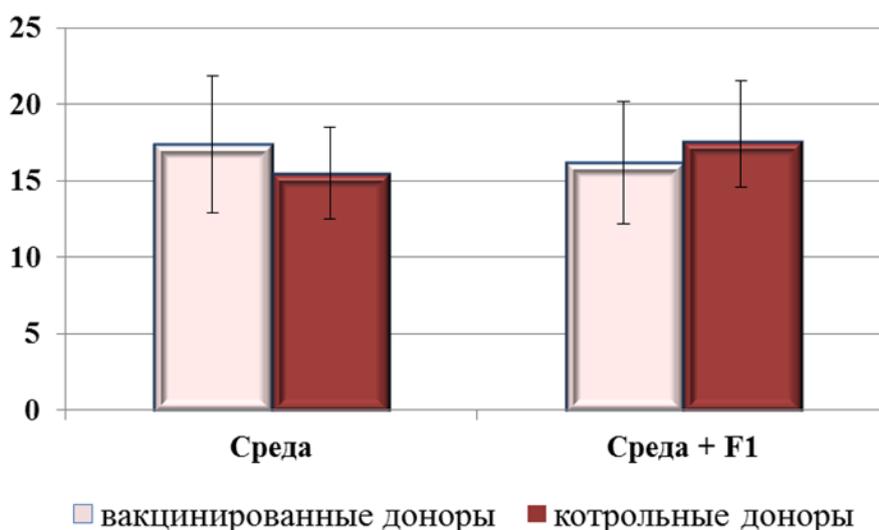
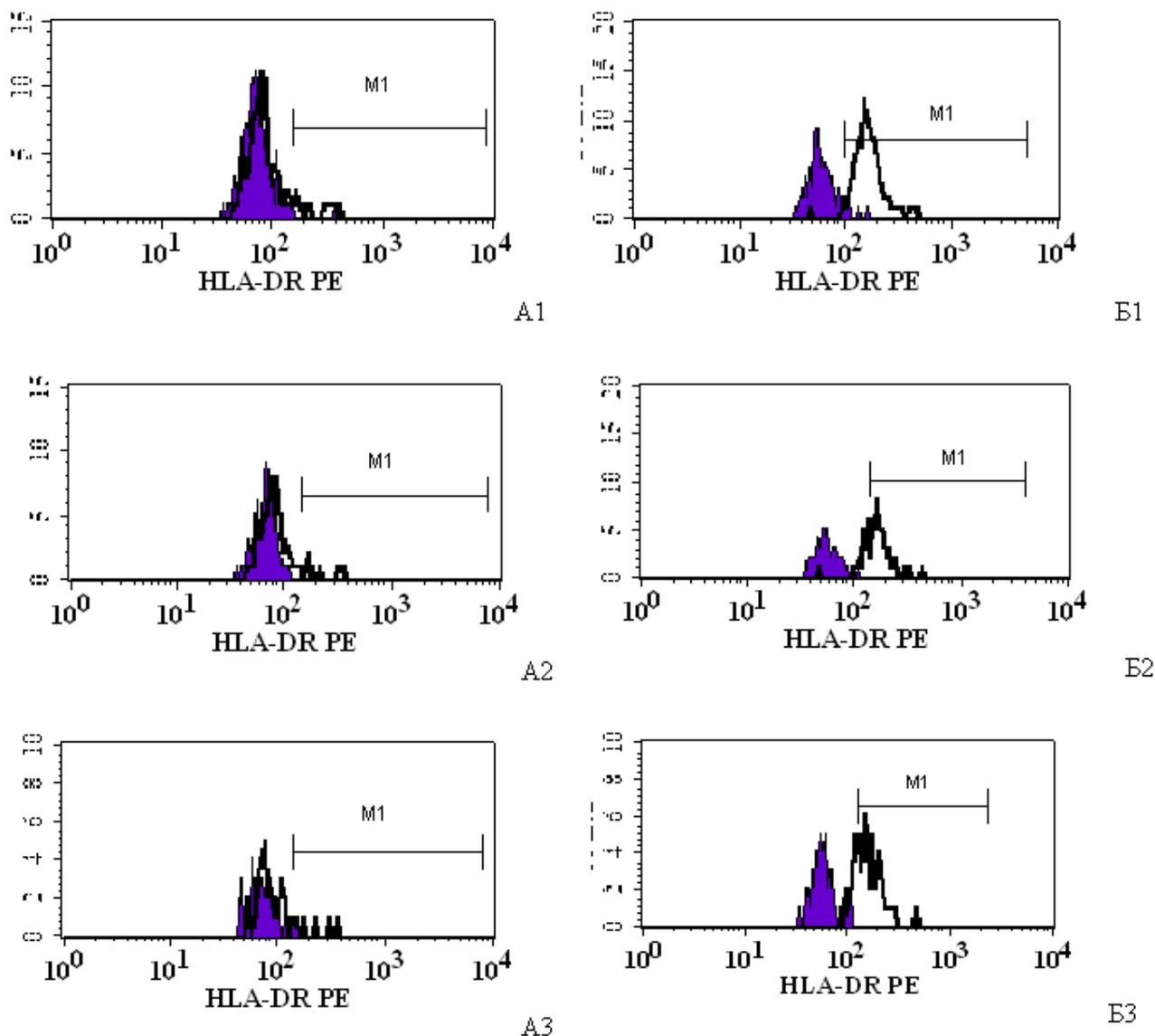


Рис. 3. Изменение экспрессии CD107b маркера на поверхности цитотоксических лимфоцитов, полученных от вакцинированных против чумы и контрольных доноров, под влиянием F1 антигена *Y. pestis*

Таблица 1. Изменение процентного содержания активированных (HLA-DR+) субпопуляций Т-лимфоцитов памяти (CD45RO+), полученных от иммунизированных живой чумной вакциной и невакцинированных доноров, под влиянием F1 антигена *Y. pestis*

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



**Рис. 4. Примеры цитофлюорограм, отражающих изменение процентного содержания субпопуляции CD3+CD45RO+HLADR+ (A1, Б1), CD3+CD4+CD45RO+HLADR+ (A2, Б2), CD3+CD8+CD45RO+HLADR+ (A3, Б3) клеток, полученных от иммунизированных живой чумной вакциной доноров (Б) и невакцинированных людей (А), под влиянием F1 *Y. pestis***

Заштрихованная область – цитофлюорограммы культур клеток, инкубированных в среде, контур - цитофлюорограммы культур клеток, стимулированных F1 антигеном

### Заключение

Таким образом, титры антител к F1 антигену у людей, периодически вакцинирующихся против чумы на протяжении более 20 лет, были низкими и не у всех увеличивались после очередной вакцинации. Анализ изменения маркеров активации лимфоцитов CD69, CD107, HLA-DR под влиянием F1 антигена показал достоверные различия между группой вакцинируемых и контрольных

доноров только в субпопуляции лимфоцитов памяти. Показано, что у людей, вакцинированных против чумы, под влиянием F1 антигена происходит специфическое усиление экспрессии HLA-DR маркера на поверхности Т-лимфоцитов памяти. По изменению количества CD3+CD45RO+HLADR+ субпопуляции клеток под влиянием F1 антигена можно косвенно выявлять наличие противочумного клеточного иммунитета у людей.

## Литература

1. Williamson E.D., Flick-Smith H.C., LeButt C. et al. Human Immune Response to a Plague Vaccine Comprising Recombinant F1 and V Antigens. *Infection and immunity*. 2005. № 6: 3598–3608.
2. Williamson E.D., Oyston P.C. *Plague vaccines*. Vaccines Elsevier: 6-th edition, 2013, 573 p.
3. Ehrenkranz N.J., Meyer K.F. Studies on immunization against plague. VIII. Study of three immunizing preparations in protecting primates against pneumonic plague. *J. Infect. Dis.* 1955; №96: 138–144.
4. Feodorova V.A., Corbel M.J. Prospects for new plague vaccines. *Expert Rev. Vaccines* 2009; №8: 1721-1738.
5. Feodorova V.A., Motin V.L. Plague vaccines. In Feodorova V.A., Motin V.L., editors. *Vaccine Against Bacterial Biothreat Pathogens*, Kerala, India: Research Signpost; 2011: 175-233.
6. Meyer K.F., Smith G., Foster L.E. et al. Plague immunization. IV. Clinical reactions and serologic response to inoculations of Haffkine and freeze-dried plague vaccine. *J. Infect. Dis.* 1974; №129: 30-36.
7. Anisimov A.P., Amoako K.K., treatment of plaque: promising to antibiotics. *J of Medical Microbiology* 2006; №55 (11): 1461-1475.
8. Bei Li, Ruifu Yang. Interaction between *Yersinia pestis* and the Host Immune System. *Infection and immunity* 2008; №76 (5): 1804–1811
9. Braciale V.L., Nash M., Sinha N. et al. Correlates of immunity elicited by live *Yersinia pestis* vaccine. In: Georgiev V.S., Western K.A., McGowan J.J., editors. *National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH: Frontiers in Research*, Totowa, NJ, Humana Press, 2008; №1: 473-480.
10. Feodorova V.A., Lyapina A.M., Ulianov O.V. et al. Serologic Markers for Long-Term Immunity in Humans Vaccinated with Live *Yersinia pestis* EV N11EG. *Procedia in Vaccinology* 2012; №6: 10 – 13.
11. Тараненко Т. М. Углеводсодержащие антигены чумного и псевдотуберкулезного микробов: дисс. д-ра мед. наук: 03.00.07 Микробиология. Саратов, 1988. 260 с.
12. Коробкова Е.И. Живая противочумная вакцина. М.: Медгиз, 1956, 206 с.
13. Узенцов С.А., Кузнецова Л.И., Г.Мороз В.П. и др. Кожная реактивность к аллергенам чумного микроба у иммунных морских свинок при одновременной постановке нескольких кожных проб//Проблемы особо опасных инф. 1973; Вып. 4 (32): 62-67.
14. Емельянова Н.В. Влияние антигенов и штаммов чумного микроба с экспрессией различных детерминант иммуногенности и вирулентности на уровень бласттрансформации лимфоцитов и активность интерлейкинов (1 и 2) при формировании иммунитета к чуме: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 14.00.36/ Емельянова Наталья Вячеславовна. Саратов, 1993. 175 с.
15. Zauberman A., Cohen S., Levy Y. et al. Neutralization of *Yersinia pestis*-mediated macrophage cytotoxicity by anti-LcrV antibodies and its correlation with protective immunity in a mouse model of bubonic plague. *Vaccine* 2008; №26 (13): 1616-1625.
16. Bashaw J., Norris S., Weeks S. et al. Development of In Vitro Correlate Assays of Immunity to Infection with *Yersinia pestis*. *Clin. Vaccine Immunol.* 2007; №14 (5): 605-616.
17. Williamson E.D. The Role of Immune Correlates and Surrogate Markers in the Development of Vaccines and Immunotherapies for Plague. *Advances in Preventive Medicine*. 2012; Article ID 365980, 7 p.
18. Parent M.A., Berggren K.N., Kummer L.W. et al. Cell-mediated protection against pulmonary *Yersinia pestis* infection. *Infect Immun.* 2005; №73: 7304-7310.
19. Wong P., Pamer E.G. CD8 T cell responses to infectious pathogens. *Annu Rev Immunol.* 2003; №21: 29-70.
20. Betts M.R., Koup R.A. Detection of T-cell degranulation: CD107a and b// *Methods Cell Biol.* 2004; №75: 497-512.

## Сведения об авторах:

Фирстова Виктория Валерьевна (Firstova V.V.) – кандидат биологических наук, заведующая сектором инфекционной иммунологии отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН ГНЦ ПМБ. 142279, Московская обл., Серпуховский р-он, п. Оболенск. E-mail: firstova@obolensk.org

Калмантаева Ольга Валериевна (Kalmantaeva O.V.) – младший научный сотрудник сектора инфекционной иммунологии отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН ГНЦ ПМБ. 142279, Московская обл., Серпуховский р-он, п. Оболенск.

Горбатов Алексей Александрович (Gorbatov A.A.) - младший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН ГНЦ ПМБ. 142279, Московская обл., Серпуховский р-он, п. Оболенск.

Кравченко Татьяна Борисовна (Krauchenko T.B.) - кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ ПМБ. 142279, Московская обл., Серпуховский р-он, п. Оболенск.

Тюрин Евгений Александрович (Tjurin E.A.) – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, заведующий лабораторией биологической безопасности ФБУН ГНЦ ПМБ. 142279, Московская обл., Серпуховский р-он, п. Оболенск.

Бондаренко Н.Л. (Bondarenko N.L.) – кандидат медицинских наук, доцент кафедры клинической иммунологии и аллергологии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России. 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

Дятлов И.А. (Dyatlov I.A.) – член-корреспондент РАН, профессор, доктор медицинских наук, профессор, директор ФБУН ГНЦ ПМБ. 142279, Московская обл., Серпуховский р-он, п. Оболенск.

Караулов А.В. (Karaulov A.V.) – член-корреспондент РАН, профессор, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой клинической иммунологии и аллергологии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России. 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

Поступила 7.09.2015 г.