

КАРЦЕВА АЛЕНА СЕРГЕЕВНА

**МЕХАНИЗМЫ ИММУНИТЕТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТУЛЯРЕМИИ НА
МЫШИНОЙ МОДЕЛИ**

Специальности: 1.5.6. Биотехнология

1.5.11. Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации.

Научный руководитель:

Фирстова Виктория Валерьевна, доктор биологических наук (3.2.7. Аллергология и иммунология), Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, лаборатория молекулярной биологии, главный научный сотрудник.

Официальные оппоненты:

Павлович Наталья Владимировна, доктор медицинских наук (1.5.11. Микробиология), Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, лаборатория туляремии, ведущий научный сотрудник, г. Ростов-на-Дону;

Саяпина Лидия Васильевна, доктор медицинских наук (1.5.11. Микробиология) Федеральное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, управление экспертизы противобактериальных иммунобиологических препаратов, главный эксперт, г. Москва.

Ведущая организация:

Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Иркутск.

Защита диссертации состоится **«26» мая 2023 г.** в 11-00 часов на заседании диссертационного совета 64.1.002.01 на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации по адресу: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», д. 24.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации.

Автореферат разослан «_____» _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета 64.1.002.01

кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. На территории России существует большое количество природных очагов туляремии, что определяет повышенное внимание к этой инфекции. Несмотря на проводимую в эндемичных районах вакцинопрофилактику, ежегодно отмечаются спорадические случаи заболевания среди населения, в отдельные годы носящие характер вспышек (Мещерякова *и др.*, 2016; Кудрявцева *и др.*, 2021).

В настоящее время эффективную защиту против туляремии обеспечивают только живые вакцины, полученные на основе аттенуированных штаммов *Francisella tularensis* (Kormilitsyna *et al.*, 2022). В Российской Федерации используется живая туляремийная вакцина *F. tularensis* 15 НИИЭГ (Timofeev *et al.*, 2020), в странах Европы и Северной Америки для производства экспериментальной вакцины используют штамм *F. tularensis* LVS – производный вакцинного штамма 15 НИИЭГ (Jia *et al.*, 2018). Существующие вакцинные штаммы способны индуцировать формирование напряженного иммунитета против туляремии (Roberts *et al.*, 2018). Однако неясный механизм аттенуации, генетическая нестабильность и относительно высокая реактогенность, особенно для людей с иммунодефицитным состоянием, делают актуальной задачей создание безопасной живой туляремийной вакцины с улучшенными свойствами (Jia *et al.*, 2018; Nicol *et al.*, 2021; Michell *et al.*, 2010).

Современные молекулярно-генетические методы позволяют изучать основы патогенности туляремийного микроба и целенаправленно снижать вирулентность бактерий для конструирования вакцинного штамма с улучшенными свойствами за счёт делеций и модификаций определенных генов (Rowe *et al.*, 2015; Kormilitsyna *et al.*, 2022). Важным условием успешного конструирования вакцинных штаммов является наличие объективных иммунологических критериев оценки протективности (Anderson *et al.*, 2010; Elkins *et al.*, 2016; Eneslätt *et al.*, 2012; Nicol *et al.*, 2021). Известно, что ключевым звеном в формировании защиты организма от внутриклеточных бактерий *F. tularensis* является специфичный Т-клеточный иммунитет, который определяет основу длительного протективного иммунитета при последующем заражении вирулентным штаммом (Roberts *et al.*, 2018; Anderson *et al.*, 2010; Nicol *et al.*, 2021). Оценка специфичного Т-клеточного ответа является технически сложной задачей, поскольку Т-клетки являются гетерогенной популяцией лимфоцитов, и их функциональная активность опосредуется различными механизмами, включая секрецию цитокинов, цитолиз инфицированных клеток и формирование иммунологической памяти (Seder *et al.*, 2008). Иммунизация мышей штаммом *F. tularensis* LVS приводит к индукции синтеза специфичных антител и пулов антиген-специфичных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток. Один из известных защитных механизмов противотуляремийного Т-клеточного иммунитета включает продукцию широкого

спектра цитокинов, в частности, IFN- γ и TNF- α (Roberts *et al.*, 2018). Однако относительный вклад субпопуляций Т-клеток и уровень их функциональной активности, необходимый для формирования протективного иммунитета против туляремии, до конца не изучен. Комплексных исследований по изучению показателей клеточного иммунного ответа, индуцированного вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, и оценки взаимосвязи между иммунологическими параметрами и протективной эффективностью в отдаленные поствакцинальные сроки не проводилось.

Поэтому исследования, направленные на изучение клеточных механизмов протективного иммунитета при моделировании экспериментальной туляремии, сохраняют актуальность для рациональной разработки противотуляремийных вакцин.

Степень разработанности темы исследования. Многолетнее изучение возбудителя туляремии позволило охарактеризовать уникальные свойства бактерий (Meibom *et al.*, 2010), определить их факторы патогенности и механизмы, ответственные за внутриклеточное размножение (Jia *et al.*, 2018). К настоящему времени опубликовано большое количество работ, посвященных изучению реакций врожденной иммунной системы на внедрение *F. tularensis* (Meunier *et al.*, 2015; Wallet *et al.*, 2016; Krocova *et al.*, 2017; Lagrange *et al.*, 2018; Kubelkova *et al.*, 2019), участие в этом процессе нейтрофилов (Kinkead *et al.*, 2017; Pulavendran *et al.*, 2020), макрофагов (Steiner *et al.*, 2017; Steiner *et al.*, 2018) и дендритных клеток (De Pascalis *et al.*, 2020; Nelson *et al.*, 2019).

В обзорной статье Q. Jia *et al.* (2018) систематизированы данные о полученных на настоящий момент перспективных аттенуированных штаммах *F. tularensis* – кандидатах в вакцинные. Во ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» на основе вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ были сконструированы штаммы 15/23-1 Δ recA и 15/23-1/sodB Δ recA, обладающие сниженной способностью размножаться в макрофагах за счёт делеций одной копии гена *iglC* (Мокриевич *и др.*, 2015) и модификации гена *sodB* (Сотникова *и др.*, 2016), и характеризующихся генетической стабильностью за счёт делеции гена *recA* (Мокриевич *и др.*, 2015). Молекулярно-генетические модификации привели к уменьшению вирулентности рекомбинантных штаммов для мышей с сохранением протективных свойств исходного родительского штамма. Однако до настоящего времени комплексные исследования по оценке иммунологической эффективности вакцинации модифицированными штаммами *F. tularensis* 15/23-1 Δ recA и *F. tularensis* 15/23-1/sodB Δ recA не проводились.

Основная часть проводимых исследований сосредоточена на изучении иммунологических реакций, отражающих защиту мышей против вирулентных

штаммов *F. tularensis* на 21-28 сутки после вакцинации (Kirimanjeswara *et al.*, 2008; Conlan *et al.*, 2005). В литературе нет сведений об иммуногенных свойствах вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его рекомбинантных вариантов с точки зрения их способности индуцировать дифференцировку CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток памяти на центральные (Т_{СМ}) и эффекторные (Т_{ЕМ}), их цитокин-продуцирующей активности и пролиферативного потенциала. Актуальность определения иммунологических параметров, позволяющих оценивать эффективность долгосрочного поствакцинального иммунитета и его протективность при туляремии, очевидна.

В процессе работы основное внимание было сосредоточено на изучении клеточных механизмов, лежащих в основе формирования протективного иммунитета у мышей линии BALB/c, определении иммунологических критериев его оценки и роли выявленных показателей в долгосрочной защите после окончания активной фазы иммунного ответа, индуцированного иммунизацией препаратами на основе аттенуированных штаммов *F. tularensis*.

Цель исследования:

изучить клеточные механизмы иммунного ответа у мышей на вакцинацию штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производными и установить их роль в формировании протективного иммунитета против природных туляремийных штаммов.

Задачи исследования:

1. Провести сравнительный анализ протективных свойств модифицированных штаммов *F. tularensis* 15/23-1 Δ *recA* и *F. tularensis* 15/23-1/*sodB* Δ *recA* с существующей туляремийной вакциной на основе штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ при подкожном заражении мышей природными штаммами *F. tularensis* 503 subsp. *holartica* и *F. tularensis* Schu subsp. *tularensis* в отдаленные сроки экспериментальной туляремии.

2. Провести сравнение клеточных реакций у мышей линии BALB/c в раннюю фазу иммунного ответа на иммунизацию модифицированными штаммами *F. tularensis* 15/23-1 Δ *recA* и *F. tularensis* 15/23-1/*sodB* Δ *recA* и вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

3. Сравнить субпопуляционный состав и функциональную активность лимфоцитов у мышей после иммунизации модифицированными штаммами *F. tularensis* 15/23-1 Δ *recA* и *F. tularensis* 15/23-1/*sodB* Δ *recA* и живой туляремийной вакциной в эффекторную фазу иммунного ответа и отдаленные поствакцинальные сроки.

4. Оценить эффективность формирования и длительность сохранения Т-клеточной иммунологической памяти у мышей, индуцированную иммунизацией модифицированными штаммами *F. tularensis* 15/23-1 Δ *recA* и *F. tularensis* 15/23-1/*sodB* Δ *recA* и живой туляремийной вакциной.

5. Определить иммунологические критерии оценки протективного противотуляреминого иммунитета на мышинной модели.

Научная новизна исследования. Установлено, что использованные в работе модификации генома *F. tularensis* (в генах *iglC*, *recA* и *sodB*) не влияют на напряженность и длительность иммунитета, но при этом снижают реактогенность рекомбинантных штаммов *F. tularensis* 15/23-1 Δ *recA* и *F. tularensis* 15/23-1/*sodB* Δ *recA*, по сравнению с исходным вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, о чем свидетельствует более низкий уровень TNF- α в сыворотке крови мышей на 3-5 сут после иммунизации.

Показано, что длительность поствакцинального иммунитета у мышей зависит от подвидовой принадлежности природного заражающего штамма: заражение природным штаммом *F. tularensis* 503 того же подвида *holarctica*, что и вакцинный штамм, обеспечивает 100 % защиту в течение 180 сут после вакцинации; заражение природным штаммом *F. tularensis* Schu подвида *tularensis* – приводит к ослаблению защиты с увеличением поствакцинального периода.

Описаны изменения уровней экспрессий 5 маркеров активации (CD69, CD25, CD30, CD28 и CD86) на поверхности лимфоцитов в крови и селезенке мышей линии BALB/c в раннюю фазу иммунного ответа при иммунизации рекомбинантными штаммами *F. tularensis* 15/23-1 Δ *recA* и *F. tularensis* 15/23-1/*sodB* Δ *recA* и живой туляреминой вакциной.

Показана динамика изменения субпопуляционного состава Т-клеток памяти в зависимости от времени, прошедшего после иммунизации штаммами *F. tularensis*. Выявлено, что продолжительность специфичной защиты мышей от природного штамма *F. tularensis* Schu subsp. *tularensis* находится в прямой зависимости от функциональной активности T_{EM} и T_{CM}.

Теоретическая и практическая значимость. Дополнены современные представления о ранних этапах формирования противотуляреминого иммунитета при иммунизации мышей живой вакциной. Использование рекомбинантных штаммов с делецией генов *iglC* и *recA* и модификации гена *sodB*, уменьшающих вирулентность штаммов, позволило выявить механизм снижения реактогенности штаммов по цитокиновому профилю сыворотки крови мышей линии BALB/c.

Полученные новые данные о роли различных субпопуляций Т-клеток памяти в формировании длительного протективного иммунитета в отношении природных штаммов *F. tularensis* подвидов *tularensis* и *holarctica* расширяют представления о механизмах формирования иммунного ответа у мышей после введения живых аттенуированных штаммов *F. tularensis*.

Предложены иммунологические критерии оценки протективной эффективности существующей и разрабатываемых противотуляремийных вакцин на основе аттенуированных штаммов *F. tularensis*, которые используются в лаборатории микробиологии туляремии отдела особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ ПМБ (акт внедрения от 23.01.2023 г.) – учрежденческий уровень внедрения.

Создана База данных «Показатели противотуляремийного иммунитета на модели мышей линии BALB/c» (зарегистрирована ФИПС № 2020621186 от 10.07.2020 г.) – федеральный уровень внедрения.

Материалы диссертационной работы использованы в учебной Программе дополнительного профессионального образования «Бактериология. Основы биологической безопасности и практика работ с микроорганизмами I-IV групп патогенности» при ФБУН ГНЦ ПМБ (справка от 10.01.2023 г.) и при подготовке кадров высшей квалификации (аспирантуре) по направлению 1.5 – Биологические науки, профиль 1.5.11 – микробиология (справка №82 от 12.01.2023 г.) – учрежденческий уровень внедрения.

Методология и методы исследования. Методология диссертационной работы заключалась в комплексном подходе к изучению клеточных механизмов протективного иммунитета у мышей, вызванного иммунизацией вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производными, и выборе иммунологических критериев для его оценки на мышинной модели экспериментальной туляремии.

Микробиологические методы. В работе использовали 5 штаммов *F. tularensis*: 15 НИИЭГ subsp. *holarctica* – вакцинный штамм, 15/23-1 Δ *recA* – вариант штамма 15 НИИЭГ с инактивированной одной из двух копий гена *iglC* и делетированным геном *recA*, 15/23-1/*sodB* Δ *recA* – вариант штамма 15/23-1 Δ *recA* с модифицированным геном *sodB*, Schu subsp. *tularensis* – природный штамм и 503 subsp. *holarctica* – природный штамм, полученных из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФБУН ГНЦ ПМБ («ГКПМ-Оболенск»). Культивирование штаммов *F. tularensis* проводили на плотной питательной среде FT-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ). Анализ обсемененности селезенок иммунизированных и интактных животных после инфицирования природным штаммом *F. tularensis* Schu проводили, как описано ранее (Карцева и др., 2022).

Биотехнологические методы. В работе были использованы туляремийные антигены: препарат кислото-нерастворимого комплекса (КНК) *F. tularensis* для специфической *in vitro* стимуляции лимфоцитов (Сомов и др., 2017) и препарат липополисахарида (ЛПС) *F. tularensis* высокой степени очистки в качестве адсорбированного антигена в непрямом иммуноферментном анализе (ИФА) (Горбатов и др., 2019).

Биологические методы. Эксперименты на животных проводили в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета о защите животных от 22.09.2010, СП 1.3.2322-08 и ветеринарным протоколом № ВП-2017/2А от 20.06.2017. Лабораторные животные. В работе использовали мышей инбредной линии VALB/c(H2^d) (питомник «Пушино», ФИБХ РАН, Московская обл., г. Пушино), массой (19 ± 1) г, возрастом – 6-8 недель. Иммунизацию мышей осуществляли однократно подкожно в дозе от 30 до 100 микробных клеток (м.к.)/мл штаммами *F. tularensis*, в зависимости от предварительно оцененной вирулентности (LD₅₀ – летальная доза для 50 % популяции животных) каждого из штаммов: 15 НИИЭГ – 79 м.к./мышь, 15/23-1Δ*recA* – 2·10⁴ м.к./мышь, 15/23-1/*sodB*Δ*recA* – 3·10⁴ м.к./мышь. Для оценки иммунологической эффективности вакцинных препаратов отбирали кровь и селезенки по ранее опубликованным методикам (Карцева и др., 2021). Протективную эффективность вакцинации оценивали после подкожного заражения мышей вирулентными штаммами *F. tularensis* Schu subsp. *holarctica* и 503 subsp. *tularensis* в дозах 1000 DCL (100 %-процентная летальная доза). Дозы заражения подтверждали высевам бактериальной суспензии на плотную питательную среду – FT-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия).

Иммунологические методы. Иммунологические исследования проводили на 3, 5, 30, 60, 90 и 180 сут после вакцинации. Титры антител к ЛПС *F. tularensis* в сыворотке крови определяли методом ИФА, как описано ранее (Карцева и др., 2021). Содержание цитокинов в сыворотке крови определяли с помощью мультиплексного анализа на системе «Bio-plex» (BioRad, США) и коммерческого набора Miliplex map со стандартной панелью на 32 цитокина (Merk, Германия). Спонтанную и антиген-индуцированную продукцию цитокинов лимфоцитами оценивали методом ИФА с использованием коммерческих наборов для определения IFN-γ, IL-17A, IL-10 и IL-4 (BD, США) и методом проточной цитофлуометрии (внутриклеточный синтез IFN-γ, TNF-α и IL-4).

Методы проточной цитометрии. Субпопуляционный состав и функциональную активность лимфоцитов определяли методом прямой иммунофлуоресценции с использованием моноклональных антител (BD Biosciences, США), конъюгированных с различными флуорохромами: CD45 APC-су7 (клон 30-F11); CD19 APC (клон 1D3); CD3 FITC, CD3 APC и CD3 BV421 (клон 17A2); CD4 APC и CD4 BV700 (клон RM4-5); CD8 APC-су7, CD8 PE и CD8 APC (клон 53-6.7); CD62L FITC (клон MEL14); CD44 PE (клон IM7); CD69 BV421, CD69 FITC и CD69 PE (клон H1.2F3); CD25 PerCP-су5.5 (клон PC61); CD30 PE (клон mCD30.1); CD86 PE (клон GL1); CD28 PerCP-су5.5 (клон 37.51); IFN-γ PerCP-су5.5 и IFN-γ APC (клон XMG1.2); TNF-α APC (клон MP6-XT22); IL-4 PE (клон 11B11). Для стимуляции лимфоцитов использовали КНК *F. tularensis*.

Пробоподготовку выполняли по опубликованной методике (Карцева *и др.*, 2022). Анализ образцов клеток проводили на проточном цитофлуориметре FACSAria III (BD Biosciences, США) с помощью программного обеспечения BD FACSDiva Software v8.0.1.

Статистические методы. Статистическую обработку результатов проводили в программе GraphPad Prism 6.00 для Windows (GraphPad Prism Software, США). Сравнение двух экспериментальных групп между собой осуществляли при помощи U-критерия Манна-Уитни. Сравнение четырех групп между собой выполняли с применением однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим попарным сравнением групп при помощи критерия Тьюки. Корреляционно-регрессионный анализ выполняли при помощи коэффициента ранговой корреляции по Спирмену. Оценку протективной активности проводили по методу Каплана-Мейера. Различия считали статистически значимыми, если значение p не превышало 0,05.

Положения, выносимые на защиту:

1. Подкожное введение штаммов *F. tularensis* subsp. *holartica* 15 НИИЭГ, 15/23-1 Δ *recA* и 15/23-1/*sodB* Δ *recA* обеспечивает 100 %-ную защиту от гибели мышам линии BALB/c при подкожном заражении гомологичным вирулентным штаммом *F. tularensis* 503 subsp. *holartica* на протяжении 180 сут. При заражении штаммом *F. tularensis* Schu subsp. *tularensis* уровень защиты зависит от срока, прошедшего с момента иммунизации, и снижается после 60 сут.

2. Иммунизация штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производными индуцирует антительный иммунный ответ и формирование пулов антиген-специфичных В- и Т-клеток, которые проявляют свою функциональную активность посредством пролиферации, экспрессии маркеров активации и продукции цитокинов.

3. Эффективность вакцинации при экспериментальной туляремии на мышинной модели зависит от подвиговой принадлежности природного штамма, используемого при заражении, и коррелирует с функциональной активностью субпопуляций T_{CM} и T_{EM} CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток памяти.

Степень достоверности и апробация результатов. Работа выполнена в лаборатории молекулярной биологии Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» в рамках НИР Роспотребнадзора «Поиск специфических клеточных маркеров, отражающих напряженность иммунитета против особо опасных инфекций» 2015-2020 гг. (номер регистрации ЕГИСМ 116030310014), «Изучение механизмов иммунопатогенеза возбудителей инфекционных заболеваний» 2021-2025 гг. (номер регистрации ЕГИСМ 121022500226-1) и «Изучение геномной эволюции возбудителя туляремии с целью выявления влияния эволюционных изменений генома на

экспрессию факторов патогенности *Fransicella tularensis*» 2021-2025 гг. (номер регистрации ЕГИСМ 121021500051-2).

Достоверность результатов обеспечивается проведением исследовательских работ современными методами, в соответствии с международными рекомендациями. Результаты диссертационной работы были представлены, доложены и обсуждены на 15 Всероссийских и международных конференциях: II Национальный конгресс бактериологов (Санкт-Петербург, 20-22.09.2016 г.); II Всероссийская научно-практическая конференция «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» (Ставрополь, 5-6.04.2017 г.); FEMS 2017 (Валенсия, 9-13.07.2017 г.); IV Всероссийская междисциплинарная научно-практическая конференция с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания» (Сочи, 1-4.11.2017 г.); XI съезд Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (Москва, 16-17.11.2017 г.); IX Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (Иркутск, 5-7.12.2017 г.) – устный доклад; Всероссийский Конгресс по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (XXI Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург, 6-8.06.2018 г.) – постерный доклад; 15-я Международная конференция по врожденному иммунитету памяти Алессандро Моретты (о. Крит, 18-23.06.2018 г.); X Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (Московская обл., Серпуховский район, 24-26.10.2018 г.) – устный доклад; XI Ежегодный Всероссийский Конгресс по инфекционным болезням с международным участием «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы» (Москва, 1-3.04.2019 г.); Всероссийский Конгресс по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (XXII Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург, 12-15.06.2019 г.); XIV Всероссийская конференция с международным участием «Иммунологические чтения в г. Челябинске» (Челябинск, 25-31.08.2019 г.) – постерный доклад; Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Современная иммунопрофилактика: вызовы, возможности, перспективы» (Москва, 17-18.11.2019 г.) – устный доклад; 7-я Международная конференция «Ситуационные центры и информационно-аналитические системы для задач мониторинга и безопасности (SCVRT2019)» (Пушино, 13.11.2019 г.) – устный доклад; Всероссийский Конгресс по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (XXII Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург, 8-11.06.2020 г.) – постерный доклад.

Личное участие автора заключалось в анализе научной литературы, разработке дизайна научного исследования, выполнении микробиологических, биологических, иммунологических, цитометрических исследований, в статистическом анализе полученных результатов и подготовке материалов для публикаций, в представлении устных и постерных докладов на конференциях. Отдельные разделы работы

выполнены совместно с д.б.н. Павловым В.М., д.м.н. Мокриевичем А.Н., к.м.н. Титаревой Г.М., к.б.н. Комбаровою Т.И., к.б.н. Калмантаевою О.В., н.с. Мироновою Р.И., н.с. Вахрамеевою Г.М. и м.н.с. Силкиной М.В.

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 17 научных работ, в том числе 3 статьи в журналах из списка изданий, рекомендованных ВАК РФ, 1 База данных, 1 статья в прочих изданиях и 12 тезисов в материалах международных и Всероссийских научных конференций.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 172 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы, включающего 32 работы отечественных и 250 работ зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 30 рисунками и 5 таблицами, включает 1 Приложение.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Протективная эффективность вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производных

На 30, 60, 90 и 180 сут после иммунизации проводили оценку протективных свойств вакцинных препаратов после подкожного заражения природными штаммами *F. tularensis* Schu subsp. *tularensis* и *F. tularensis* 503 subsp. *holarctica*. Установлено, что иммунизация вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производными 15/23-1 Δ recA и 15/23-1/sodB Δ recA приводила к формированию долгосрочной защиты у мышей в течение 180 сут после вакцинации при заражении природным штаммом *F. tularensis* 503 subsp. *holarctica* (рис. 1 А). Однако, при заражении иммунизированных мышей природным штаммом *F. tularensis* Schu subsp. *tularensis* уровень защиты снижался с увеличением поствакцинального периода до 60 сут (рис. 1 Б).

Несмотря на отсутствие павших животных во всех группах иммунизированных мышей при заражении штаммом *F. tularensis* 503 subsp. *holarctica*, животные значительно теряли в весе на 180 сут после вакцинации, что свидетельствует об ослаблении иммунитета (рис. 1 А). Во всех группах иммунизированных животных при последующем заражении природным штаммом *F. tularensis* Schu subsp. *tularensis* отмечалось более медленное нарастание веса во все периоды наблюдения (рис. 1 Б).

Эти данные сопоставимы со снижением выживаемости после 60 сут, что свидетельствует о тяжелом течении инфекции. Таким образом, оценка динамики изменения веса отражает тяжесть инфекционного процесса и может быть использована в качестве дополнительного параметра косвенной оценки протективных свойств изучаемых вакцинных препаратов.

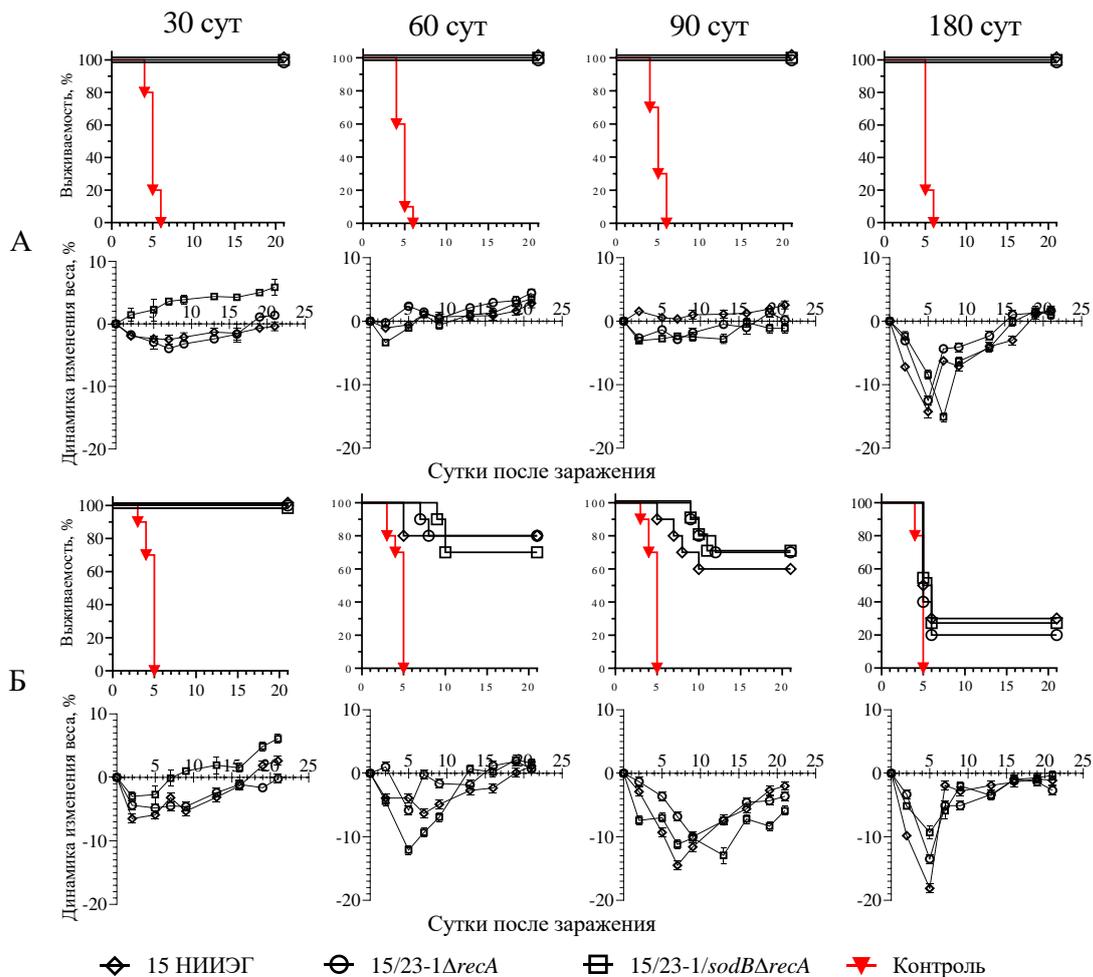


Рис. 1 – Динамика выживаемости и веса мышей после подкожного заражения природными штаммами *F. tularensis* 503 (А) и Schu (Б) в зависимости от времени, прошедшего после иммунизации.

На 30 сут после иммунизации несмотря на 100 % выживаемость во всех группах вакцинированных мышей после заражения природным штаммом *F. tularensis* Schu, наши дальнейшие исследования выявили явные различия в способности животных контролировать инфекцию (рис. 2).

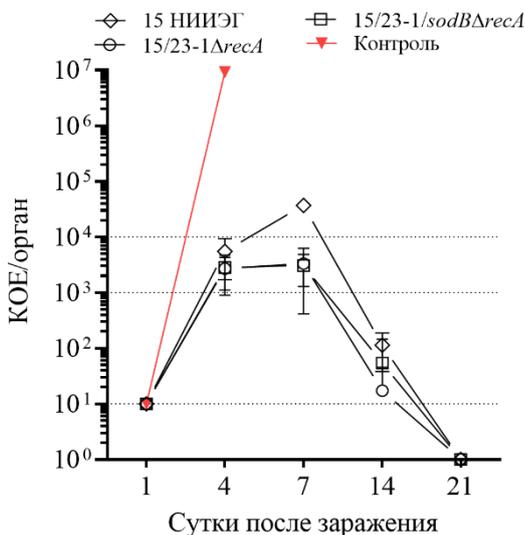


Рис. 2 – Обсемененность селезенки после заражения мышей природным штаммом *F. tularensis* Schu на 30 сут после вакцинации штаммом *F. tularensis* и его производными.

Показано, что иммунизация штаммами *F. tularensis* 15/23-1 Δ recA или *F. tularensis* 15/23-1/sodB Δ recA обеспечивала достоверное снижение обсемененности селезенки мышей по сравнению с аналогичным показателем в группе мышей, иммунизированных исходным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Все интактные животные погибали на 5 сут инфекционного процесса, что свидетельствовало о генерализации процесса в отличие от иммунизированных животных.

Прогностическая оценка реактогенности новых вакцинных штаммов *F. tularensis* по цитокиновому профилю сыворотки крови мышей в ранние сроки после вакцинации

Специфичный иммунный ответ представляет собой реакцию преимущественно популяции лимфоцитов, однако его запуск и осуществление невозможны без участия клеточных и гуморальных компонентов системы врожденного иммунитета. В ходе дальнейших исследований мы изучали цитокиновый профиль у мышей, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производными штаммами 15/23-1 Δ recA и 15/23-1/sodB Δ recA в ранние сроки иммуногенеза.

Ключевыми цитокинами при туляремийной инфекции являются IFN- γ и TNF- α (Roberts *et al.*, 2018). Во всех группах иммунизированных мышей уже на 3 сут мы наблюдали увеличение IFN- γ (рис. 3). Следует отметить, что иммунизация исходным вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ индуцировала более выраженный синтез TNF- α (в 13-19 раз), чем вакцинация рекомбинантными штаммами *F. tularensis* 15/23-1 Δ recA (4-5 раз) и *F. tularensis* 15/23-1/sodB Δ recA (в 4 раза), что указывает на снижение реактогенности новых аттенуированных штаммов (Cowley *et al.*, 2007).

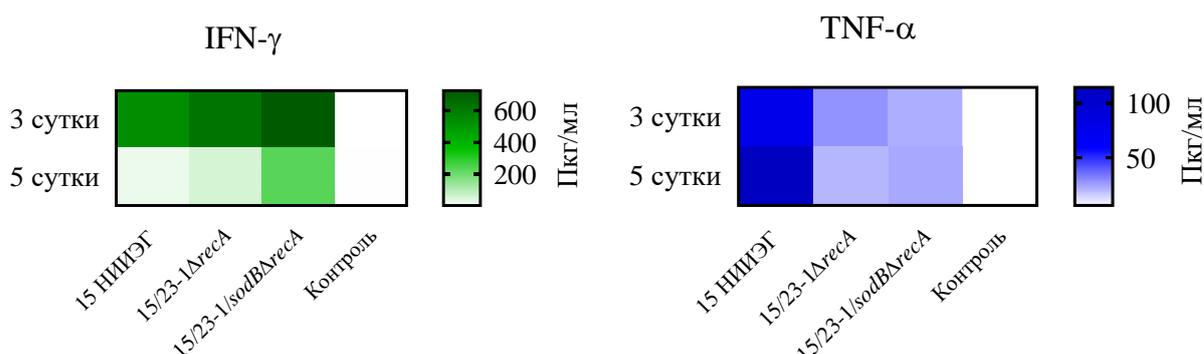


Рис. 3 – Концентрация цитокинов IFN- γ и TNF- α в сыворотке крови мышей линии BALB/c на 3 и 5 сут после иммунизации штаммами *F. tularensis*.

Иммунизация мышей всеми штаммами *F. tularensis* приводила к увеличению в их сыворотке крови уровней колониестимулирующих факторов (G-CSF, GM-CSF, M-CSF) и хемокинов (LIX, IP-10, KC, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2 и MIG) (рис. 4). Повышение уровней цитокинов Т-хелперных клонов первого (IL-2 и IL-15) и второго (IL-5, IL-9 и IL-13) типов у иммунных мышей говорило о запуске активации клеточного и гуморального иммунитета и указывает на иммунный ответ смешанной Th1/Th2-

направленности (Симбирцев *и др.*, 2004). Об активации иммунных клеток также свидетельствовало увеличение концентраций провоспалительных цитокинов IL-1 α и IL-6 во всех группах иммунизированных животных по сравнению с контролем.

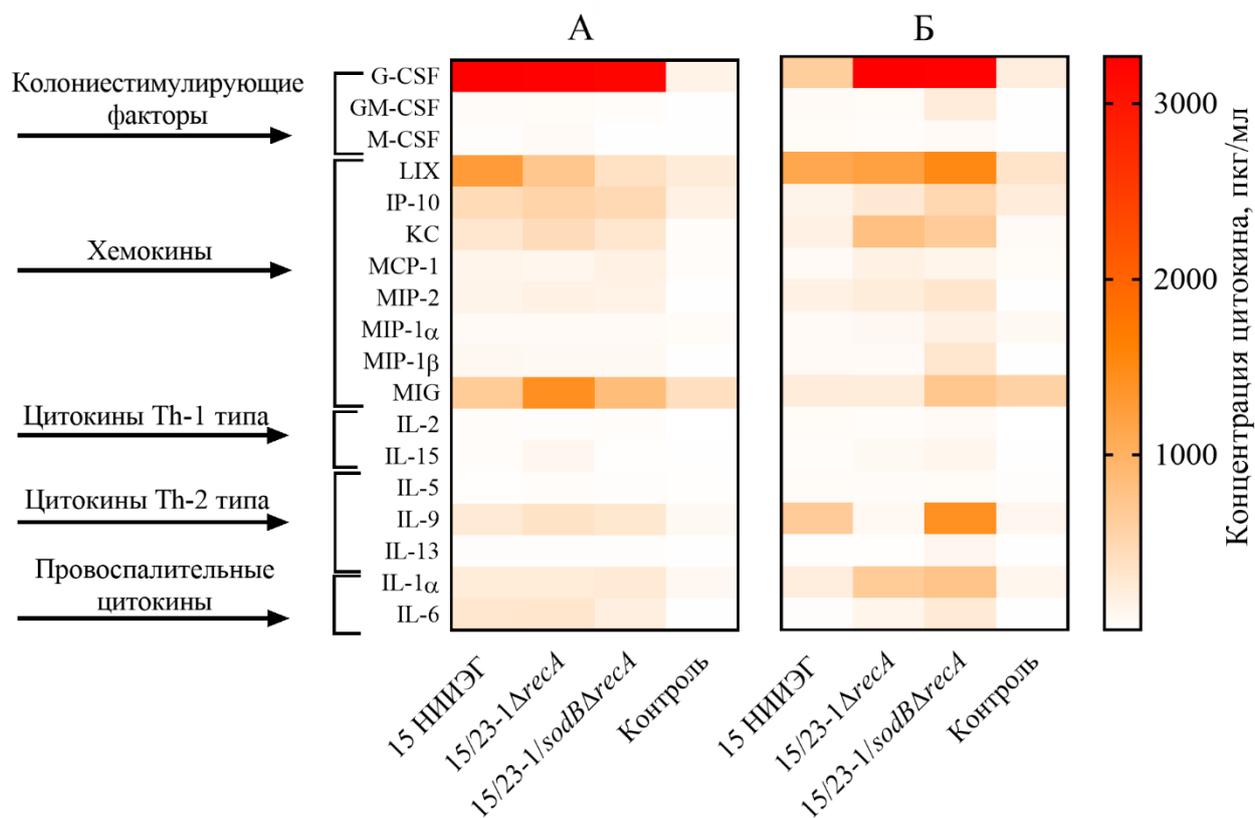


Рис. 4 – Концентрация цитокинов в сыворотке крови мышей линии BALB/c на 3 (А) и 5 (Б) сут после иммунизации штаммами *F. tularensis*.

Взаимосвязь субпопуляционного состава и функциональной активности лимфоцитов иммунных мышей и эффективности защиты мышей линии BALB/c от природных штаммов на разных стадиях иммунного ответа

В ходе работы был проведен анализ уровней специфичных антител к ЛПС *F. tularensis* в сыворотке крови мышей линии BALB/c методом ИФА и цитокин-продуцирующих В-клеток путем окрашивания внутриклеточных IFN- γ и IL-4 у иммунизированных и интактных мышей. На 30 сут после иммунизации вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производными штаммами 15/23-1 Δ recA и 15/23-1/sodB Δ recA во всех группах животных детектировали IgG антитела к ЛПС *F. tularensis*. Сравнительный анализ полученных данных показал, что значения титров антител IgG к ЛПС *F. tularensis* в сыворотке крови мышей достоверно не различались ($p > 0,05$) между группами иммунизированных животных и составляли 1:400. С увеличением поствакцинального срока до 60, 90 и 180 сут, достоверных различий ни по срокам отбора сывороток, ни между группами иммунизированных животных выявлено не было (Карцева *и др.*, 2021).

Показано, что В-клетки способны регулировать специфические иммунные реакции с помощью дополнительных, независимых от антител, механизмов. Анализ цитокин-продуцирующей активности В-клеток показал (рис. 5), что во всех группах иммунизированных мышей наблюдали антиген-индуцированное увеличение процентного содержания $CD19^+IFN-\gamma^+$ клеток и отсутствие достоверных ($p > 0,05$) изменений в процентном содержании В-клеток с фенотипом $CD19^+IL-4^+$.

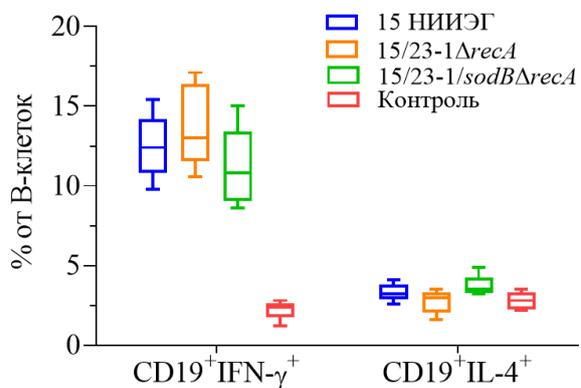


Рис. 5 – Титры специфичных антител в сыворотке крови мышей линии BALB/c (А) и процентное содержание цитокин-продуцирующих В-клеток (Б) у иммунных и интактных мышей.

Таким образом, В-клетки играли определенную роль в специфическом иммунном ответе на вакцинацию мышей штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производными, эффекторная функция которых заключалась в продукции $IFN-\gamma$ и синтезе специфичных антител.

В разные сроки иммуногенеза, индуцированного вакцинацией мышей штаммами *F. tularensis*, были оценены уровни экспрессии $CD69$ – раннего маркера активации клеток, который широко применяется для изучения эффекторной функции лимфоцитов (Miki-Hosokawa *et al.*, 2009; Vega-Ramos *et al.*, 2010). Во всех группах иммунизированных животных установлено достоверное ($p < 0,05$) антиген-индуцированное повышение процентного содержания активированных $CD19^+$, $CD4^+$ и $CD8^+$ лимфоцитов, в сравнении с показателями контрольной группы (рис. 6).

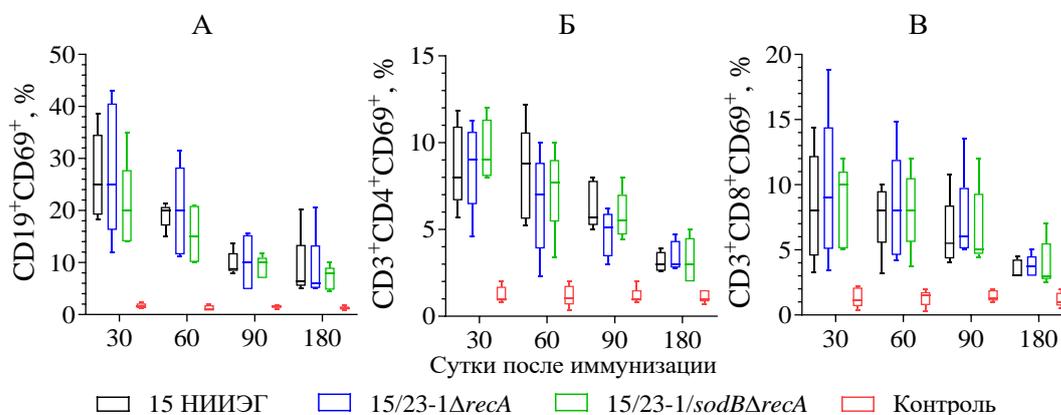


Рис. 6 – Антиген-индуцированное изменение процентного содержания активированных В-клеток (А), Т-хелперов (Б) и цитотоксических Т-лимфоцитов (В) у иммунных и интактных мышей линии BALB/c.

При увеличении срока после иммунизации наблюдали снижение относительного содержания CD69⁺ В- и Т-клеток, но даже на 180 сут после вакцинации лимфоциты были способны активироваться в ответ на стимуляцию туляремийным антигеном. Достоверных различий в доле активированных лимфоцитов между группами иммунизированных животных выявлено не было. Таким образом, можно сделать вывод, что в организме иммунных мышей сохранялись функционально активные специфичные Т- и В-клетки до 180 сут после иммунизации штаммами *F. tularensis*.

Анализ уровня цитокинов проводили методом ИФА, с использованием коммерческих наборов для определения IFN- γ , IL-17A, IL-10 и IL-4. На рис. 7 представлены уровни цитокинов, секретируемых лимфоцитами мышей в разные сроки после иммунизации.

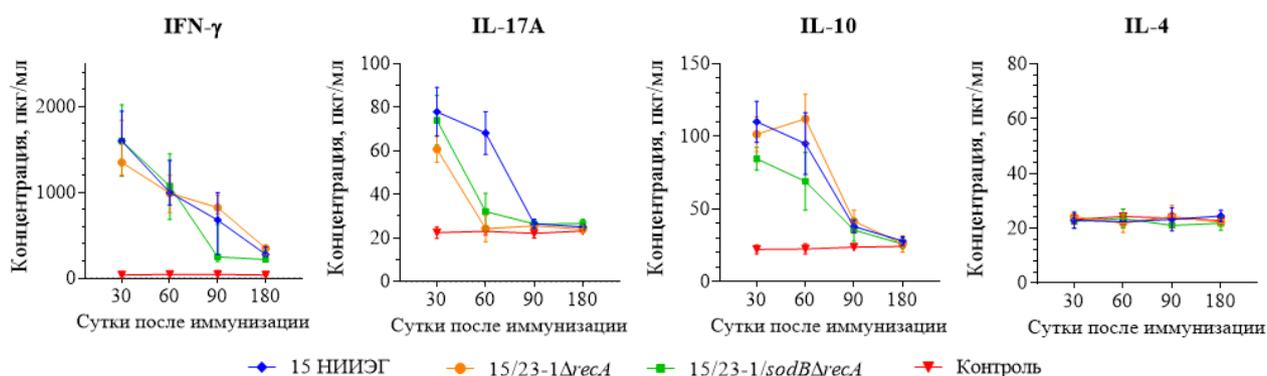


Рис. 7 – Уровень цитокинов в клеточном супернатанте лимфоцитов у иммунных и интактных мышей линии BALB/c в разные сроки после иммунизации вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производными.

Во всех группах иммунизированных животных была отмечена зависимость уровней цитокинов от поствакцинального срока: с увеличением срока после иммунизации наблюдали снижение продукции IFN- γ , IL-17A и IL-10. Тем не менее, способность специфичных лимфоцитов синтезировать IFN- γ сохранялась до 180 сут, IL-10 – до 90 сут после иммунизации всеми исследуемыми вакцинными препаратами. Достоверного изменения уровня IL-4 в группах иммунизированных и интактных животных выявлено не было во все периоды наблюдений.

Таким образом, продукция таких цитокинов как IFN- γ , IL-17A и IL-10 лимфоцитами, вероятно, указывает на смешанный иммунный ответ по Th1/Th2 пути.

По мере увеличения времени с момента вакцинации мышей штаммами *F. tularensis* проводили анализ субпопуляционного состава и функциональной активности Т-клеток памяти, определяющих долгосрочный эффект иммунизации. Функциональную активность T_{EM} и T_{CM} в пуле CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток оценивали по уровню экспрессии раннего маркера активации CD69 и продукции IFN- γ и TNF- α . В качестве специфического индуктора в условиях *in vitro* использовали туляремийный антиген.

Цитометрический анализ субпопуляций CD69⁺ Т-клеток памяти в отдаленные поствакцинальные сроки (60-90 сут) показал, что с увеличением периода после иммунизации мышей исследуемыми аттенуированными штаммами *F. tularensis* наблюдали снижение активированных T_{CM} и T_{EM} в пуле CD8⁺ Т-клеток (рис. 8 В и 8 Г) и отсутствие статистически значимых различий в процентном содержании активированных T_{CM} и T_{EM} в пуле CD4⁺ Т-клеток (рис. 8 А и 8 Б).

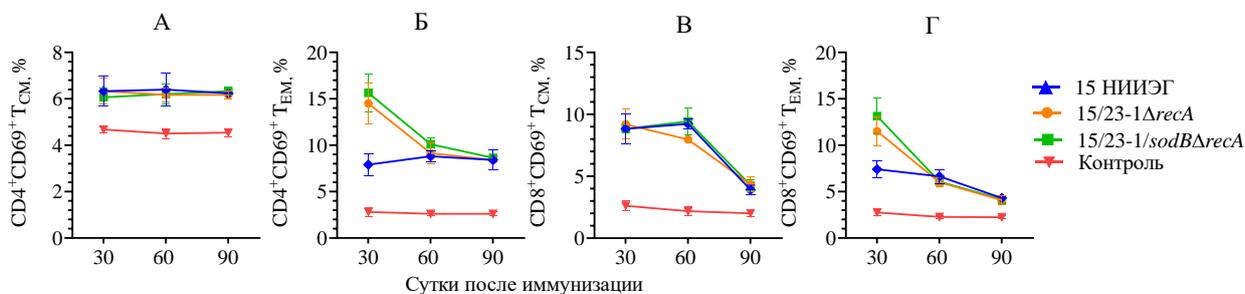


Рис. 8 – Активированные T_{CM} и T_{EM} в пуле CD4⁺ (А, Б) и CD8⁺ (В, Г) Т-клеток в селезенке мышей в зависимости от времени, прошедшего после вакцинации аттенуированными штаммами *F. tularensis*.

После окончания активной фазы (30 сут) иммунного ответа во всех группах вакцинированных мышей, регистрировали снижение цитокин-продуцирующей активности T_{EM} в пуле CD4⁺ (рис. 9 Б) и CD8⁺ (рис. 9 Г). Полученные данные согласуются с опубликованными ранее сведениями о том, что после завершения эффекторной фазы Т-клеточного иммунного ответа большая часть T_{EM} подвергается апоптозу, и для формирования долгосрочной защиты необходимо, чтобы вакцина индуцировала генерацию T_{CM}, способных при повторной встрече с антигеном быстро пролиферировать и дифференцироваться в T_{EM}, которые, в свою очередь, за счёт цитокин-продуцирующей активности и контактного цитолиза, успешно элиминируют патоген (Esser *et al.*, 2003; Henaо-Tamayo *et al.*, 2010).

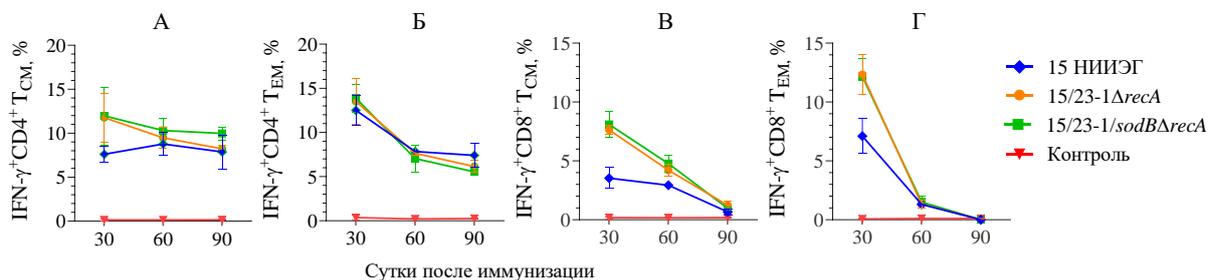


Рис. 9 – Цитокин-продуцирующие CD4⁺ (А) и CD8⁺ (Б) Т-клетки памяти в селезенке мышей линии BALB/c в зависимости от времени, прошедшего после вакцинации аттенуированными штаммами *F. tularensis*.

Показано, что в отдаленные сроки после вакцинации мышей исследуемыми штаммами *F. tularensis* различий в функциональной активности CD4⁺ Т-клеток памяти выявлено не было. Даже спустя 90 сут после иммунизации животных штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производными 15/23-1ΔrecA и 15/23-1/sodBΔrecA детектировали

специфичные CD4⁺ Т-клетки памяти с фенотипами T_{EM} и T_{CM}, продуцирующие IFN- γ (рис. 9 А-Б) и экспрессирующие маркер активации лимфоцитов CD69 (рис. 8 А-Б). Полученные данные объясняют механизм защиты мышей от заражения гомологичным природным штаммом *F. tularensis* 503 subsp. *holarctica* до 90 сут после вакцинации.

Сопоставляя данные по обсемененности (рис. 2) и результаты иммунологических исследований можно предположить, что ослабление контроля за размножением штамма *F. tularensis* Schu в селезенках мышей, вакцинированных штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, связано с меньшим количеством активированных CD4⁺ и CD8⁺ T_{EM} (рис. 8 Б и 8 Г), по сравнению с группами животных, иммунизированных модифицированными штаммами. Анализ цитокин-продуцирующих T_{EM} и T_{CM} показал, что иммунизация рекомбинантными штаммами *F. tularensis* 15/23-1 Δ recA и 15/23-1/sodB Δ recA приводила к более высокому синтезу IFN- γ CD8⁺ T_{EM} (рис. 9 В) и CD8⁺ T_{CM} (рис. 9 Г), а иммунизация исходным вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, напротив, приводила к увеличению TNF- α -продуцирующих CD4⁺ и CD8⁺ T_{EM} клеток памяти (Карцева *и др.*, 2022). На наш взгляд, это и является причиной снижения реактогенности новых аттенуированных штаммов и более эффективной защиты при последующем заражении природным штаммом.

Выбор иммунологических показателей для оценки протективной эффективности экспериментальных вакцинных штаммов *F. tularensis*

При анализе полученных данных о выживаемости и цитометрического исследования была отмечена зависимость уровня защиты иммунизированных мышей после заражения природным штаммом *F. tularensis* Schu subsp. *tularensis* от функциональной активности антиген-специфичных лимфоцитов. На следующем этапе работы проведен корреляционный анализ для выбора иммунологических критериев оценки протективной эффективности иммунизации. Использование в работе панели вакцинных штаммов со схожими протективными и иммуногенными свойствами позволило повысить степень достоверности результатов исследования. На рис. 10 представлены результаты корреляционного анализа между выживаемостью мышей линии BALB/c и уровнем экспрессии CD69 молекулы на поверхности CD8⁺, CD4⁺ и CD19⁺ лимфоцитов.

Выявлена прямая корреляционная связь высокой силы по шкале Чеддока между показателем выживаемости животных после заражения природным штаммом *F. tularensis* Schu и долей CD8⁺, CD4⁺ и CD19⁺ лимфоцитов, экспрессирующих маркер ранней активации CD69. Полученные данные позволили заключить, что оценка уровня антиген-индуцированной экспрессии CD69 маркера на поверхности лимфоцитов является адекватным иммунологическим показателем напряженности поствакцинального противотуляремиального иммунитета на мышинной модели.

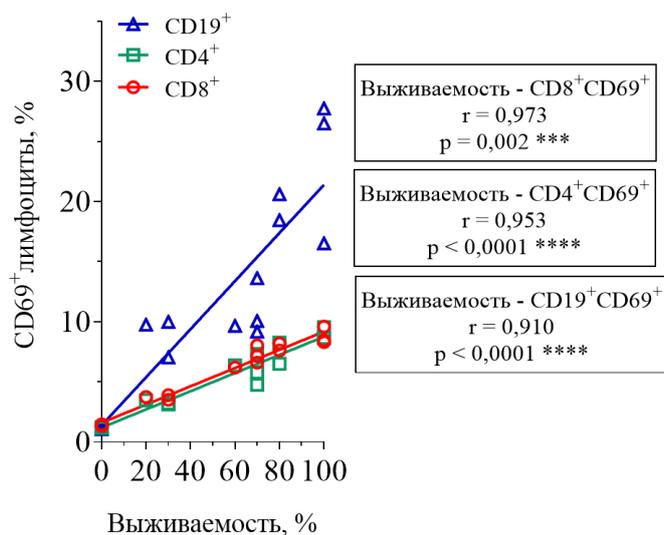


Рис. 10 – Корреляционный анализ между показателем выживаемости мышей линии BALB/c после заражения их природным штаммом *F. tularensis* Schu и долей активированных лимфоцитов.

Далее изучена взаимосвязь показателя выживаемости животных после заражения природным штаммом *F. tularensis* Schu и уровнем продукции IFN- γ . На рис. 11 показано, что выявлена прямая корреляционная зависимость между долей выживших животных после заражения вирулентным штаммом *F. tularensis* Schu и антиген-индуцированным повышением уровня IFN- γ , синтезируемым лимфоцитами иммунизированных мышей.

Таким образом, информативным иммунологическим показателем можно считать IFN- γ , рассматривая антиген-индуцированное повышение продукции данного цитокина в качестве критерия оценки протективной эффективности иммунизации аттенуированными штаммами *F. tularensis* на мышинной модели.

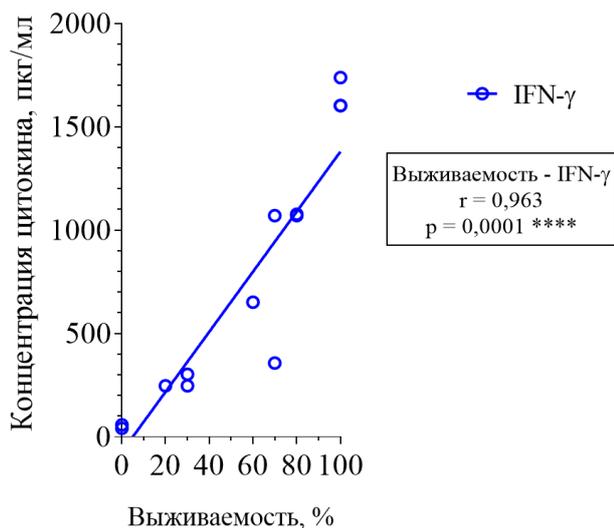


Рис. 11 – Корреляционный анализ между показателем выживаемости мышей линии BALB/c после заражения природным штаммом *F. tularensis* Schu и антиген-индуцированной продукцией IFN- γ в супернатантах лимфоцитов.

Выявленный факт корреляции ($p < 0,05$) между выживаемостью иммунизированных мышей линии BALB/c после заражения природным штаммом *F. tularensis* Schu и долями активированных CD4⁺ T_{EM} ($r = 0,742$), CD8⁺ T_{CM} ($r = 0,767$) и CD8⁺ T_{EM} ($r = 0,931$) позволил сделать вывод о перспективности использования данных иммунологических параметров в качестве критериев оценки протективности

поствакцинального иммунитета у мышей (рис. 12 А). Корреляционная связь между показателями выживаемости и содержанием $CD4^+CD69^+$ T_{CM} была статистически незначимой ($p > 0,05$).

Выявленные коэффициенты корреляции позволили сделать вывод о достоверной ($p < 0,05$) статистической зависимости между показателем выживаемости животных после заражения природным штаммом *F. tularensis* Schu и долями $IFN\gamma$ -продуцирующих Т-клеток памяти с фенотипами $CD4^+$ T_{CM} ($r = 0,712$), $CD4^+$ T_{EM} ($r = 0,934$), $CD8^+$ T_{CM} ($r = 0,889$) и $CD8^+$ T_{EM} ($r = 0,755$) (рис. 12 Б).

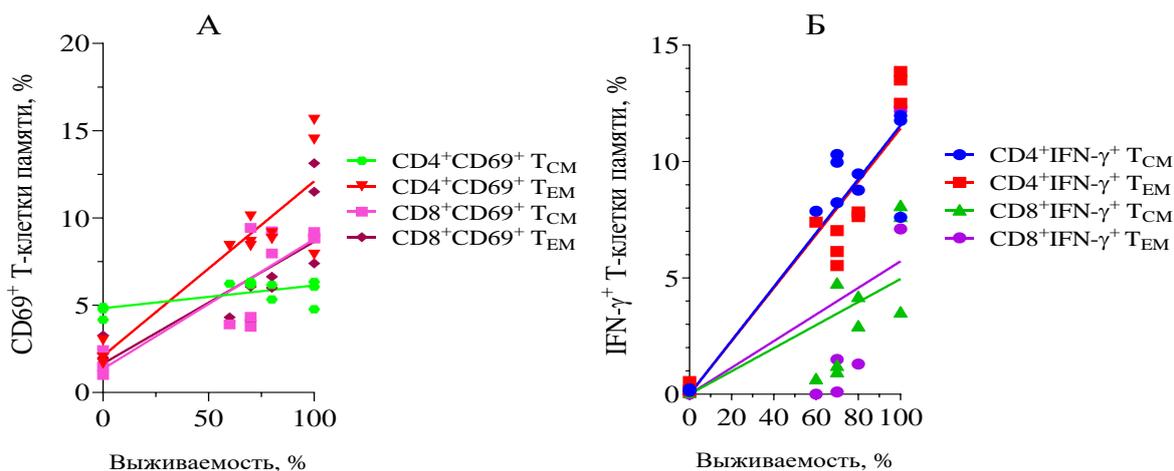


Рис. 12 – Корреляционный анализ между показателем выживаемости мышей после заражения природным штаммом *F. tularensis* Schu и активированными (А) и цитокин-продуцирующими (Б) субпопуляциями Т-клеток памяти.

Заключение

Настоящая работа посвящена изучению клеточных механизмов формирования поствакцинальной защиты мышей линии BALB/c при экспериментальной туляремийной инфекции. Установлено, что эффективность защиты у мышей при иммунизации вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производными *F. tularensis* 15/23-1 Δ recA и 15/23-1/sodB Δ recA зависит от подвидовой принадлежности природного заражающего штамма. Заражение природным штаммом *F. tularensis* 503 subsp. *holarctica* той же подвидовой принадлежности, что и вакцинный, обеспечивает более длительную 100% защиту (180 сут) после вакцинации, в отличие от заражения природным штаммом *F. tularensis* Schu subsp. *tularensis*, для которого эффективная 100 % защита сохраняется лишь до 60 сут.

На 30 сут и в отдаленные сроки после иммунизации мышей вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производными было отмечено, что до 180 суток после вакцинации аттенуированными штаммами *F. tularensis* во всех группах иммунизированных животных детектировали сопоставимые уровни IgG антител к ЛПС *F. tularensis*. Иммунизация исследуемыми вакцинными штаммами приводила к

формированию у мышей пулов специфичных лимфоцитов, функциональная активность которых была опосредована экспрессией маркера активации CD69 и синтезом IFN- γ , IL-17A и IL-10. С увеличением поствакцинального срока выявлена тенденция к снижению функциональной активности специфичных Т- и В-клеток.

Эксперименты по оценке Т-клеточной иммунологической памяти показали, что иммунизация мышей штаммами *F. tularensis* 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 CD69 молекулы и продукции цитокинов IFN- γ и TNF- α . Выявлено, что снижение количества и угасание функциональной активности субпопуляций CD8⁺ T_{CM} и T_{EM} в отдаленные сроки после вакцинации штаммами *F. tularensis* приводило к ослаблению защиты после заражения мышей природным штаммом *F. tularensis* Schu subsp. *tularensis*. Согласно литературным данным, одним из объяснений угасания протективного иммунитета против внутриклеточных инфекций с течением времени является снижение пула долгоживущих T_{CM} (Esser *et al.*, 2003; Henaо-Tamayo *et al.*, 2010). Вероятно, 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 и 90 сут после вакцинации мышей туляремиийными штаммами.

Корреляционный анализ между показателем выживаемости мышей после заражения природным штаммом *F. tularensis* Schu subsp. *tularensis* и показателями функциональной активности антиген-специфичных лимфоцитов с целью выбора иммунологических критериев оценки протективной эффективности иммунизации показал, что информативными иммунологическими показателями защиты мышей от заражения природным штаммом *F. tularensis* Schu можно считать антиген-индуцированное повышение уровней синтеза IFN- γ и экспрессии CD69 лимфоцитами. Выявленные коэффициенты корреляции позволили говорить о статистически достоверной связи между показателем выживаемости животных после заражения природным штаммом *F. tularensis* Schu и долями активированных цитокин-продуцирующих Т-клеток памяти с фенотипами CD4⁺ T_{EM}, CD8⁺ T_{CM} и CD8⁺ T_{EM}. Антиген-индуцированное повышение продукции цитокинов IFN- γ и TNF- α и экспрессии маркера активации CD69 рекомендованы в качестве иммунологических критериев протективной эффективности иммунизации мышей аттенуированными штаммами *F. tularensis*.

ВЫВОДЫ

1. Исследованные в работе модифицированные штаммы *F. tularensis* 15/23-1 Δ recA и 15/23-1/*sodB* Δ recA сохраняли протективные свойства на уровне исходного штамма

F. tularensis 15 НИИЭГ. Иммунизация вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производными обеспечивала 100 % выживаемость мышей линии BALB/c от подкожного заражения природным штаммом *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503 в течение 180 сут, при заражении природным штаммом *F. tularensis* subsp. *tularensis* Schu – уровень защиты снижался после 60 сут.

2. Выявлены различия в ранних поствакцинальных иммунных реакциях мышей на рекомбинантные штаммы *F. tularensis* 15/23-1 Δ *recA* и 15/23-1/*sodB* Δ *recA*, в сравнении с таковым, вызванным родительском штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ. На снижение реактогенности новых аттенуированных штаммов указывал более низкий уровень TNF- α в сыворотке крови мышей на 3-5 сут после вакцинации: в группе мышей, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15/23-1 Δ *recA* – в 3,6-4,8 раз; штаммом *F. tularensis* 15/23-1/*sodB* Δ *recA* – в 3,6-4,1 раза; штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ – в 13,0-19,3 раза.

3. Выявлено, что иммунизация мышей рекомбинантными штаммами *F. tularensis* 15/23-1 Δ *recA* и 15/23-1/*sodB* Δ *recA*, а также вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, приводила к формированию у мышей пулов специфичных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток и CD19⁺ В-клеток, экспрессирующих маркер активации CD69, и синтезу цитокинов IFN- γ , IL-17A и IL-10.

4. Иммунизация мышей штаммами *F. tularensis* 15/23-1 Δ *recA*, 15/23-1/*sodB* Δ *recA* и 15 НИИЭГ индуцировала дифференцировку CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток памяти на субпопуляции T_{EM} и T_{CM}, которые проявляли свою эффекторную функцию посредством экспрессии CD69 молекулы и продукции цитокинов IFN- γ и TNF- α . Выявлен высокий коэффициент корреляции между уровнем защиты иммунизированных мышей после заражения природным штаммом *F. tularensis* Schu subsp. *tularensis* и функциональной активностью T_{CM} и T_{EM}.

5. В качестве иммунологических критериев для оценки протективной эффективности иммунизации мышей кандидатными вакцинными штаммами *F. tularensis* могут быть использованы клеточные тесты, основанные на выявлении антиген-индуцированной функциональной активности T_{EM} и T_{CM} по уровню экспрессии маркера активации CD69 и синтеза IFN- γ и TNF- α .

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИИ

1. Разработанная База данных «Показатели противотуляремийного иммунитета на модели мышей линии BALB/c» может быть использована в качестве современного программного обеспечения для изучения иммунного ответа мышей на вакцинацию аттенуированными штаммами *F. tularensis*.

2. Предложенные иммунологические критерии оценки протективного противотуляремийного иммунитета могут быть использованы для скрининга новых потенциальных вакцинных штаммов.

3. Для оценки долгосрочного поствакцинального протективного иммунитета при туляремии на мышинной модели рекомендуем проводить анализ функциональной активности субпопуляций Т-клеток памяти в отдаленные сроки после иммунизации.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

А. Статьи в реферируемых научных журналах

1. **Карцева, А.С.** Характеристика иммуногенных и протективных свойств модифицированных вариантов штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ / **А.С. Карцева**, О.В. Калмантаева, М.В. Силкина, Т.И. Комбарова, В.М. Павлов, А.Н. Мокриевич, В.В. Фирстова // Пробл. Особо Опасн. Инф. – 2020. – №3. – С. 62-69. Scopus, SJR = 0,216, Цит. 2.

2. **Карцева, А.С.** Выбор критериев оценки протективного иммунитета в разные сроки экспериментальной туляремии на мышинной модели / **А.С. Карцева**, Г.М. Титарева, А.Н. Мокриевич, Т.И. Комбарова, Г.М. Вахрамеева, Р.И. Миронова, Т.Б. Кравченко, М.В. Силкина, В.М. Павлов, В.В. Фирстова // Биотехнология. – 2021. – Т. 37 – № 4. – С. 65-77. Scopus, SJR = 0,139, Цит. 1.

3. **Карцева, А.С.** Влияние вакцинации штаммами *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ и его производными на генерацию и функциональную активность Т-клеток памяти у мышей / **А.С. Карцева**, М.В. Силкина, Г.М. Титарева, Г.М. Вахрамеева, Т.И. Комбарова, Р.И. Миронова, В.М. Павлов, А.Н. Мокриевич, В.В. Фирстова // Биотехнология. – 2022. – Т. 38 – № 3. – С. 49-61. Scopus, SJR = 0,139, Цит. 0.

Б. Зарегистрированные базы данных

4. **Карцева, А.С.** Показатели противотуляремийного иммунитета на модели мышей линии BALB/c / **А.С. Карцева**, М.В. Силкина, И.Г. Говорунов, В.В. Фирстова, О.В. Калмантаева // База данных № 2020621186 от 10.07.2020 г.

В. Статьи в других изданиях

5. **Карцева, А.С.** Сравнение раннего иммунного ответа мышей, иммунизированных туляремийным вакцинным штаммом и его производными / **А.С. Карцева**, М.В. Силкина, О.В. Калмантаева, Р.И. Миронова, В.В. Фирстова, В.М. Павлов, И.Г. Шемякин // Росс. иммунол. журнал – 2019. – Т. 13 (22) – №3. – С. 1177-1183. РИНЦ, IF = 0,671, Цит. = 1.

Г. Тезисы всероссийских и международных научных конференций

6. **Пинчук, А.С.** Выявление маркеров активации лимфоцитов в диагностике туляремии / **А.С. Пинчук**, О.В. Калмантаева, В.В. Фирстова // Мат. II Нац. конг. бактериол. Санкт-Петербург, 20-22 сентября 2016 г. / Инф. Иммунол. – 2016. – Т.6 – № 3. – С. 283-284.

7. **Пинчук, А.С.** Особенности индукции иммунного ответа бактериями штаммов *Francisella tularensis* 15/23-1ΔrecA и *Francisella tularensis* 15/23-1SodBΔRecA / **А.С. Пинчук**, О.В. Калмантаева, В.В. Фирстова, В.М. Павлов, Т.И. Комбарова, А.Н. Мокриевич, Г.М. Вахрамеева, Р.И. Миронова // Мат. II Всерос. научно-практ. конф. «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных». Ставрополь, 5-6 апреля 2017 г. – С. 258-260.

8. Firstova, V.V. Features of immunogenic properties of vaccine *Francisella tularensis* 15 NIEG derivative strains / V.V. Firstova, V.M. Pavlov, **A.S. Pinchuk**, O.V. Kalmantaeva, T.I. Kombarova, G.M. Vakhromeyeva, A.N. Mokrievich, R.I. Mironova, I.A. Dyatlov // FEMS 2017. Spain, Valencia, 9-13 July 2017. – FEMS7-2736.

9. **Пинчук, А.С.** Эффективность вакцинации лабораторных животных в отдаленные поствакцинальные сроки при заражении вирулентными штаммами *Francisella tularensis* разных подвидов / **А.С. Пинчук**, Т.И. Комбарова, Т.Б. Кравченко, В.С. Тимофеев, И.В. Бахтеева, А.Н. Мокриевич, В.В. Фирстова // Мат. IV Всерос. междисциплинар. научно-практ. конф. с международ. участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания». Сочи, 1-4 ноября 2017 г. – С. 180-181.

10. **Пинчук, А.С.** Сравнительная оценка протективных свойств вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ и потенциальных вакцинных штаммов с целенаправленными мутациями / **А.С. Пинчук**, В.С. Тимофеев, И.Р. Бахтеева, Т.И. Комбарова, Г.М. Титарева, А.А. Горбатов, А.Н. Мокриевич, В.В. Фирстова, В.М. Павлов // Мат. IV Всерос. междисциплинар. научно-практ. конф. с международ. участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания». Сочи, 1-4 ноября 2017 г. – С. 182-183.

11. **Пинчук, А.С.** Оценка эффективности вакцинации мышей линии BALB/c штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ против заражения вирулентными штаммами *F. tularensis* разных подвидов / **А.С. Пинчук**, Т.И. Комбарова, Г.М. Титарева, Т.Б. Кравченко, А.Н. Мокриевич, В.В. Фирстова // XXI Кашкинские чтения. Санкт-Петербург, 6-8 июня 2018 г. Пробл. мед. микол. – 2018. – Т. 20. – № 2. – С. 102.

12. Firstova, V.V. Early immune responses to modified vaccine strain *Francisella tularensis* SRI-1 / V.V. Firstova V.M. Pavlov, **A.S. Pinchuk**, O.V. Kalmantaeva, G.M. Vakhromeeva, R.I. Mironova, T.I. Kombarova, M.S. Sotnikova, A.N. Mokrievich, I.A. Dyatlov // 15th International Conference on Innate Immunity in memory of Alessandro Moretta. Greece, Cania Crete, 18-23 June 2018. – P. 102.

13. **Карцева, А.С.** Оценка длительности иммунопротективных свойств потенциальных вакцинных штаммов *F. tularensis* / **А.С. Карцева**, Г.М. Титарева, А.Н. Мокриевич, В.В. Фирстова // Мат. XI Ежегодного Всерос. конгр. по инф. болезням с международ. участием «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы». Москва, 1-3 апреля 2019 г. – С. 80.

14. **Карцева, А.С.** Особенности активации В-лимфоцитов у мышей, иммунизированных генетически-модифицированными штаммами *F. tularensis* / **А.С. Карцева**, М.В. Силкина, О.В. Калмантаева, Н.А. Зенинская, М.А. Марьин, Я.О. Мунтян, А.К. Рябко, М.М. Рогозин, А.С. Шахова, Г.М. Вахромеева, Р.И. Миронова, В.М. Павлов, В.В. Фирстова, И.Г. Шемякин // XXII Кашкинские чтения. Санкт-Петербург, 12-15 июня 2019 г. Пробл. мед. микол. – 2019. – Т. 21. – № 2. – С. 80.

15. **Карцева, А.С.** Оценка иммуногенных свойств штаммов *Francisella tularensis* – кандидатов в вакцинные / **А.С. Карцева**, М.В. Силкина, О.В. Калмантаева, А.Е. Хлынцева, В.В. Фирстова, И.Г. Шемякин // SCVRT2019. Пущино, 13 ноября 2019 г. – С. 93-94.

16. **Карцева, А.С.** Активация В-лимфоцитов мышей, иммунизированных генетически модифицированными вариантами штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ / **А.С. Карцева**, М.В. Силкина, О.В. Калмантаева, В.М. Павлов, Т.И. Комбарова, В.В. Фирстова // XXIII Кашкинские чтения. Санкт-Петербург, 9-11 июня 2020 г. Пробл. мед. микол. – 2020. – Т. 22. – № 3. – С. 84.

17. Силкина, М.В. Особенности активации Т-лимфоцитов после иммунизации мышей BALB/c вакцинным штаммом *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ и его производными: штаммами 15/23-1ΔIglCrecA и 15/23-1ΔIglCsodBrecA // М.В. Силкина, **А.С. Карцева**, О.В. Калмантаева, В.М. Павлов, Т.И. Комбарова, В.В. Фирстова // XXIII Кашкинские чтения. Санкт-Петербург, 9-11 июня 2020 г. Пробл. мед. микол. – 2020. – Т. 22. – № 3. – С. 126.

Примечание: Пинчук, Pinchuk – фамилия Карцевой А.С. до даты 22.09.2018 г.