

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

На правах рукописи

Карцева Алена Сергеевна

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

Специальности: 1.5.6. Биотехнология

1.5.11. Микробиология

Диссертация

на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

д.б.н. Фирстова Виктория Валерьевна

Оболенск-2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1. Общие сведения о туляремии	15
1.2. История создания живой туляремийной вакцины.....	18
1.3 Альтернативные вакцины	20
1.4 Живые аттенуированные вакцины	23
1.5 Иммунный ответ против <i>Fransicella tularensis</i>	25
1.5.1 Врожденный иммунный ответ	25
1.5.2 Адаптивный иммунный ответ.....	33
1.6 Современные представления о корреляции между защитой организма от <i>F. tularensis</i> и специфическими иммунологическими показателями	40
1.7 Заключение по обзору литературы	45
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	48
2.1 Микробиологические методы исследования	48
2.2 Биотехнологические методы исследования	49
2.3 Биологические методы исследования	49
2.4 Иммунологические методы исследования	52
2.5 Методы проточной цитометрии	54
2.6 Статистические методы исследований	59
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	61
ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ИММУННОГО ОТВЕТА У МЫШЕЙ В РАННИЕ СРОКИ ПОСЛЕ ВАКЦИНАЦИИ ШТАММАМИ <i>F. TULARENSIS</i>	61
3.1 Сравнительный анализ изменения субпопуляционного состава В-клеток крови и селезенки в ранние сроки иммуногенеза у мышей после вакцинации штаммами <i>F. tularensis</i>	62
3.2 Сравнительный анализ изменения субпопуляционного состава Т-клеток крови и селезенки в ранние сроки иммуногенеза у мышей после вакцинации штаммами <i>F. tularensis</i>	63
3.3 Определение концентраций цитокинов в сыворотке крови мышей после вакцинации штаммами <i>F. tularensis</i> в ранние сроки иммуногенеза	65
3.4 Заключение по Главе 3	67

ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТОРНОЙ ФАЗЫ ИММУННОГО ОТВЕТА У МЫШЕЙ ПОСЛЕ ВАКЦИНАЦИИ АТТЕНУИРОВАННЫМИ ШТАММАМИ <i>F. TULARENSIS</i>	71
4.1 Оценка протективных свойств вакцинного штамма <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ и его производных.....	72
4.2 Уровень титров специфических антител в сыворотке крови после иммунизации штаммами <i>F. tularensis</i>	74
4.3 Сравнительный анализ изменения субпопуляционного состава В-клеток в эффекторную фазу иммунного ответа после вакцинации мышей штаммами <i>F. tularensis</i>	75
4.4 Сравнительный анализ изменения субпопуляционного состава Т-клеток у мышей в эффекторную фазу иммунного ответа после вакцинации штаммами <i>F. tularensis</i>	77
4.5 Оценка изменения уровня цитокинов в клеточном супернатанте лимфоцитов через 30 сут после иммунизации мышей штаммами <i>F. tularensis</i>	78
4.6 Влияние вакцинации штаммами <i>F. tularensis</i> на генерацию и функциональную активность Т-клеток памяти у мышей линии BALB/с.....	80
4.6.1 Анализ субпопуляционного состава Т-клеток памяти.....	81
4.6.2 Анализ цитокин-продуцирующей активности Т-клеток памяти	85
4.6.3 Анализ пролиферативной активности Т-клеток памяти.....	87
4.7 Влияние иммунизации штаммами <i>F. tularensis</i> на обсемененность селезенки мышей после заражения природным штаммом <i>F. tularensis</i> Schu.....	89
4.8 Заключение по Главе 4	90
ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ ИММУННОГО ОТВЕТА МЫШЕЙ ЛИНИИ BALB/С В ОТДАЛЕННЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ ВАКЦИНАЦИИ АТТЕНУИРОВАННЫМИ ШТАММАМИ <i>F. TULARENSIS</i>	96
5.1 Оценка протективных свойств штамма <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ и его производных в отдаленные сроки после вакцинации у мышей.....	98
5.2 Оценка изменения титров специфических антител в сыворотке крови мышей в отдаленные сроки после иммунизации штаммами <i>F. tularensis</i>	102
5.3 Оценка изменений субпопуляционного состава лимфоцитов в отдаленные сроки после иммунизации мышей штаммами <i>F. tularensis</i>	103
5.4 Оценка изменения уровней цитокинов в клеточном супернатанте лимфоцитов в отдаленные сроки после иммунизации мышей линии BALB/с штаммами <i>F. tularensis</i>	105

5.5 Сравнительный анализ изменение функциональной активности субпопуляций Т-клеток памяти у мышей линии BALB/c в отдаленные сроки после вакцинации штаммами <i>F. tularensis</i>	108
5.5.1 Анализ субпопуляционного состава Т-клеток памяти.....	108
5.5.2 Анализ цитокин-продуцирующей активности Т-клеток памяти	112
5.6 Заключение по Главе 5	115
ГЛАВА 6. ВЫЯВЛЕНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОЦЕНКИ ПРОТЕКТИВНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ВАКЦИН НА ОСНОВЕ АТТЕНУИРОВАННЫХ ШТАММОВ <i>F. TULARENSIS</i>	120
6.1 Корреляционный анализ между показателем выживаемости мышей после заражения природным штаммом <i>F tularensis</i> Schu подвида <i>tularensis</i> и уровнем экспрессии CD69 молекулы на антиген-специфических лимфоцитах.....	120
6.2 Корреляционный анализ между показателями выживаемости мышей после заражения природным штаммом <i>F. tularensis</i> Schu подвида <i>tularensis</i> и уровнями цитокинов, секретируемых лимфоцитами.....	122
6.3 Корреляционный анализ между показателями выживаемости мышей при заражении природным штаммом <i>F. tularensis</i> подвида <i>tularensis</i> и функциональной активностью Т-клеток памяти	123
6.4 Заключение по Главе 6	125
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	126
ВЫВОДЫ	128
РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ	130
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	131
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	133
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	168
ПРИЛОЖЕНИЕ	172

ВВЕДЕНИЕ

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 [11].

В настоящее время эффективную защиту против туляремии обеспечивают только живые вакцины, полученные на основе аттенуированных штаммов *Francisella tularensis*. В Российской Федерации используется живая туляремиальная вакцина *F. tularensis* 15 НИИЭГ [226], в странах Европы и Северной Америки для производства экспериментальной вакцины используют штамм *F. tularensis* LVS – производный вакцинного штамма 15 НИИЭГ [146]. Существующие вакцинные штаммы способны индуцировать формирование напряженного иммунитета против туляремии [226]. Однако неясный механизм аттенуации, генетическая нестабильность и относительно высокая реактогенность, особенно для людей с иммунодефицитным состоянием, делают актуальной задачей создание безопасной живой туляремиальной вакцины с улучшенными свойствами [90, 112, 202, 230].

Современные молекулярно-генетические методы позволяют изучать основы патогенности туляремиального микроба и целенаправленно снижать вирулентность бактерий для конструирования вакцинного штамма с улучшенными свойствами за счёт делеций и модификаций определенных генов [232, 268]. Важным условием успешного конструирования вакцинных штаммов является наличие объективных иммунологических критериев оценки протективности [38, 110, 113, 207, 235]. Известно, что ключевым звеном в формировании защиты организма от внутриклеточных бактерий *F. tularensis* является специфический Т-клеточный иммунитет, который определяет основу длительного протективного иммунитета при последующем заражении вирулентным штаммом [38, 226, 250]. Оценка

специфического 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 [249]. Иммунизация мышей штаммом *F. tularensis* LVS приводит к индукции синтеза специфических антител и пулов антиген-специфических 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 [226]. 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 проводились.

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 [196], определить их факторы патогенности и механизмы, ответственные за внутриклеточное размножение [146]. К настоящему времени опубликовано большое количество работ, посвященных изучению реакций врожденной иммунной системы на внедрение *F. tularensis* [162, 163, 165, 201, 272], участию в этом процессе нейтрофилов [155, 156, 220], макрофагов [120, 256, 257] и дендритных клеток [105, 118, 180].

В обзорной статье Q. Jia *et al.* [146] 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* [19] и модификации гена *sodB* [31], и характеризующихся генетической стабильностью за счёт делеции гена *recA* [18]. 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 [85, 157]. 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 при повторной встрече с антигенами *F. tularensis*. 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 противотуляремийного 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 специфической защиты мышей от природного штамма *F. tularensis* Schu subsp. *tularensis* находится в прямой зависимости от функциональной активности T_{ЕМ} и T_{СМ}.

Теоретическая и практическая значимость исследования

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*, а также при изучении механизмов их действия на систему иммунитета.

Создана База данных «Показатели противотуляремийного иммунитета на модели мышей линии BALB/с» (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. Анализ научной литературы, посвященной вакцинным препаратам против туляремии, современным представлениям о корреляции защиты организма от заражения вирулентными штаммами *F. tularensis* и специфическими иммунологическими показателями, проведен на основе формально-логических методов исследования. Планирование и проведение исследований осуществляли на основе общенаучных и специфических методов.

Основными объектами исследования являлись вакцинный штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ и кандидаты для создания новой живой туляремийной вакцины – *F. tularensis* 15/23-1 Δ *recA* и *F. tularensis* 15/23-1/*sodB* Δ *recA*. В работе применяли микробиологические, биологические, биохимические, иммунологические и цитометрические методы исследований. Результаты анализировали при помощи статистических методов. 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.

Положения диссертации, 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-специфических 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 подвидовой 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 сентября 2016 г.); II Всероссийская научно-практическая конференция «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» (Ставрополь, 5-6 апреля, 2017 г.); FEMS 2017 (Валенсия, 9-13 июля, 2017 г.); IV Всероссийская междисциплинарная научно-практическая конференция с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания» (Сочи, 1-4 ноября, 2017 г.); XI съезд Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (Москва, 16-17 ноября, 2017 г.); IX Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (Иркутск, 5-7 декабря, 2017 г.) – устный доклад; Всероссийский Конгресс по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (XXI Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург, 6-8 июня, 2018 г.) – постерный доклад; 15-я Международная конференция по врожденному иммунитету памяти Алессандро Моретты (о. Крит, 18-23 июня, 2018 г.); X Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (Московская обл., Серпуховский район, 24-26 октября, 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 апреля, 2019 г.); Всероссийский Конгресс по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (XXII Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург, 12-15 июня, 2019 г.); XIV Всероссийская конференция с международным участием «Иммунологические чтения в г. Челябинске» (Челябинск, 25-31 августа, 2019 г.) – постерный доклад; Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Современная иммунопрофилактика: вызовы, возможности, перспективы» (Москва, 17-18 октября, 2019 г.) – устный доклад; 7-я Международная конференция «Ситуационные центры и информационно-аналитические системы для задач мониторинга и безопасности (SCVRT2019)» (Пущино, 13 ноября 2019 г.) – устный доклад; Всероссийский Конгресс по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (XXII Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург, 8-11 июня, 2020 г.) – постерный доклад.

Личное участие автора в получении результатов

Личный вклад автора состоит в поиске и анализе литературных данных, разработке дизайна научного исследования, в выполнении микробиологических, биологических, иммунологических и цитометрических исследований, в анализе полученных результатов и подготовке материалов для публикаций. Автор лично провел статистическую обработку и анализ полученных данных, проанализировал полученные результаты, сформулировал выводы, практические рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы. Основные теоретические и практические положения научной квалификационной работы, результаты исследования докладывались автором на международных и Всероссийских научных конференциях. Отдельные разделы работы выполнены совместно с сотр. 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. Калмантаевой О.В., н.с. Мироновой Р.И., н.с. Вахрамеевой 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 Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации, 1 статья в прочих изданиях, 1 База данных и 12 тезисов в материалах международных и Всероссийских научных конференций.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общие сведения о туляремии

Туляремия – особо опасная инфекция, являющаяся природно-очаговым зоонозом. Этиологический возбудитель этой инфекции – грамотрицательная коккобацилла – *F. tularensis* [22, 23]. В настоящее время по Международной статистической классификации болезней [15] выделяют следующие клинические формы туляремии: ульцерогландулярная туляремия (по старой классификации – язвенно-бубонная, синоним – кожно-бубонная), окулогландулярная туляремия (глазо-бубонная, офтальмическая); торакальная (легочная туляремия); абдоминальная (желудочно-кишечная туляремия); генерализованная туляремия. Выделяют также другие формы туляремии, такие как ангиозно-гландулярную; туляремию неуточненную. Абдоминальная и торакальная формы являются наиболее опасными для людей, с долей летальных случаев у пациентов при отсутствии лечения до 30-60 % [20, 24, 146].

G.W McCoy и C.W. Chapin в 1911 году первоначально назвали туляремийную бактерию как *Bacterium tularense*, которую обнаружили в качестве возбудителя «чумоподобной болезни», распространенной среди сусликов в округе Туларе, Калифорния. Бактерия была обозначена как *Pasteurella tularensis* в 1920-х годах, а затем переименована в *Francisella tularensis* в честь Эдварда Фрэнсиса, который впервые дал полное описание данного возбудителя [146].

Возбудитель туляремии относится к классу γ -протеобактерий семейства *Francisellaceae*, рода *Francisella*. Семейство *Francisellaceae* включает в себя, кроме рода *Francisella*, симбиотические бактерии рода *Wolbachia*, выделенные из клещей *Argas arboreus*, а также *Francisella*-подобные эндосимбионты, выделенные из клещей видов *Amblyomma maculatum*, *Ornithodoros porcinus*, *Ornithodoros moubata* и *Dermacentor* [62]. Ранее в роде *Francisella* выделяли два вида: *F. tularensis* и *F. philomiragia*. Однако в последнее время появился ряд публикаций, в которых

описаны случаи заболевания, вызванные новыми видами франциселл: *F. haliotica*, *F. hispaniensis*, *F. noatunensis*, *F. marina*, *F. persica* [83, 142].

Внутри вида *Francisella tularensis* на основании различий в географическом распространении, вирулентности, биохимических свойствах выделяют три подвида: *tularensis* (тип А), *holarctica* (тип В), *mediasiatica* [216]. В пределах вида *F. tularensis* выделяют четыре подвида: неарктический (*F. tularensis* subsp. *tularensis*), среднеазиатский (*F. tularensis* subsp. *mediasiatica*), голарктический (*F. tularensis* subsp. *holarctica*) и подвид *F. tularensis* subsp. *novicida* (*F. novicida*). В США и странах Западной Европы *F. tularensis* разделена на два основных биовара: тип А (*F. tularensis* subsp. *tularensis*) и тип В (*F. tularensis* подвид subsp. *holarctica*). Недавние эпидемиологические исследования четко указывают на различия в вирулентности среди биоваров типа А *F. tularensis* subsp. *tularensis* (теперь обозначается А1а, А1б и А2). Инфекции человека типа А1 соответствуют классическому описанию туляремии, вызванной подвидом *F. tularensis*, как острой фебрильной болезни с высоким уровнем смертности. SchuS4, изолят подвида *tularensis*, наиболее часто используемый для модели туляремийной инфекции, в настоящее время относится к типу А1а. Инфекции типа А2 и типа В, с другой стороны, связаны с более длительным заболеванием, которое редко приводит к летальному исходу у людей [164, 214].

Бактерии *F. tularensis* – аэробные, грамотрицательные плеоморфные коккобактерии (от кокковидных до эллипсовидных) размером 0,2-0,7×0,2 мкм (для *F. tularensis* подвидов *tularensis*, *holarctica* и *mediasiatica*) и 0,7×1,7 мкм (для *F. tularensis* подвида *novicida*). Бактерии образуют капсулу, неподвижны, спор не образуют [216]. На плотных питательных средах возбудитель туляремии формирует отчетливые, выпуклые, бледно-белые колонии, достигая максимального размера на 3–4 день [25, 210]. Для культивирования *F. tularensis* используют FT-агар, синтетическую среду Чемберлена, оптимизированную по содержанию аминикислот, а также среды, содержащие гидролизаты животного происхождения – бульон Мюллера-Хинтона, сердечна-мозговая вытяжка, триптиказо-соевый бульон [25, 171, 267] и Т-бульон [26]. Для выделения ДНК и

антигенов *F. tularensis* используют простую жидкую питательную среду для наработки биомассы туляремиального микроба [12]. В России и странах СНГ в последние годы для культивирования *F. tularensis* используют FT-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, МО).

Факторы вирулентности *F. tularensis* до сих пор остаются изучены не полностью, но недавние обзоры описывают важные достижения в понимании патогенеза [63, 67, 147]. Как и многие внутриклеточные патогены, *F. tularensis* не продуцирует токсины. Липополисахарид (ЛПС) является основным компонентом внешнего слоя наружной мембраны туляремиального микроба [222], который состоит из липида А (закрепляет его в мембране и обуславливает биологическую активность) к которому через олиго- полисахарид (кор) присоединяется О-полисахаридная цепь (О-антиген) [132]. ЛПС *F. tularensis* из-за отсутствия свободных фосфатных фрагментов обладает низкой биологической активностью и не способен индуцировать синтез провоспалительных цитокинов [17, 132].

F. tularensis также имеет в своем геноме так называемый «остров патогенности», на котором локализована группа генов, позволяющих бактерии реплицироваться в клетках млекопитающих, и, таким образом, обходить или даже активно ингибировать распознавание и иммунные реакции микроорганизма [127]. «Остров патогенности» *F. tularensis* был впервые описан в 2004 году [204]. Также был обнаружен ген *pdpA* как важный фактор вирулентности, но его точная функция, как и функции других генов *pdp* установлены не были [73, 205]. Было обнаружено, что ген *pdpD* присутствует у *F. novicida* и в штаммах *F. tularensis* подвида *tularensis*, но не подвида *holartica*, и который участвует при репликации бактерий внутри макрофагов [205, 206]. Некоторые гены «острова патогенности», такие как гены *vgrG*, *dotU* и *Igl*, обладают схожими последовательностями, а также биохимическими и структурными признаками с генами секреции типа VI других бактерий [64, 101]. Поэтому неудивительно, что продукты *vgrG* и *Igl*, как было обнаружено, секретируются бактериями во время внутриклеточной инфекции [48]. Некоторые белки «острова патогенности», например белок *IglC*, ингибирует созревание фагосом [99, 241]. Эти белки, по-видимому, также участвуют в побеге

из фагосомы и внутриклеточном выживании туляремиального микроба. Белки IgIС и clpB также участвуют в уклонении от иммунитета, так как было показано, что мутанты штаммов *F. novicida* с дефектами в этих генах не могут индуцировать секрецию простагландина E₂ (PGE₂), который в свою очередь, подавляет иммунный ответ макроорганизма ингибированием синтеза IFN-γ [278]. Стоит отметить, что большинство белков секреции VI типа, синтезируемые туляремиальными бактериями, за исключением vgrG, уникальны для рода *Francisella* [65].

Контроль активных форм кислорода и азота также является важным фактором вирулентности *F. tularensis*. Фермент KatG обладает свойствами как каталазы, так и пероксидазы, что позволяет ему инактивировать перекись водорода, а также активные формы азота [182, 255]. KatG играет значительную роль в вирулентности LVS *F. tularensis*, поскольку мутантные штаммы, лишенные функционального гена *katG*, не способны вызвать гибель мышей после внутрибрюшинной инокуляции. Напротив, *katG*-мутанты штамма Schu S4 были чувствительны к перекиси водорода и реактивным формам азота *in vitro*, но сохраняли летальность у мышей, что указывает на то, что KatG является достаточным, но не необходимым фактором вирулентности [182]. Аналогичным образом, супероксиддисмутаза SodB и SodC необходимы для устойчивости бактерий к окислительному взрыву [44, 199].

1.2. История создания живой туляремиальной вакцины

Из-за угрозы, которую туляремия представляла общественному здоровью в начале XX века, был вызван интерес к разработке вакцин. В США в 30-50-е гг. изучались первые вакцинные препараты на основе бактерий *F. tularensis*, инактивированных различными методами. Данные вакцины стимулировали выработку легко обнаруживаемых в сыворотке крови антител, но недостаточно Т-клеточный иммунитет. Такая вакцинация обеспечивала только частичную защиту от возбудителя туляремии *F. tularensis* подвида *tularensis*. Тем не менее, такая

вакцина улучшала течение болезни и приводила к снижению числа случаев заболевания туляремией [88, 93, 108].

Параллельно в СССР проводилась интенсивная работа по разработке вакцин, которая была сосредоточена на получении аттенуированных вакцинных штаммов. Результатом данной работы было получение Н.А. Гайским в 1945 г. живой туляремийной вакцины из штамма *F. tularensis* подвида *holarctica*. Аттенуирование вакцинного штамма 15 было достигнуто в результате многократных пассажей природного изолята [153]. Позже, после пассирования через животных аттенуированного штамма *F. tularensis* 15, на его основе был получен штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ (восстановленный) [6].

F. tularensis 15 НИИЭГ – штамм, на основе которого создана живая туляремийная вакцина, в настоящее время используется для профилактики туляремии в России и ряде стран СНГ [14]. Данный вакцинный штамм авирулентен для людей, кроликов и обладает сниженной вирулентностью для мелких грызунов [23].

В 1950-х годах лиофильно высушенная культура штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ была передана в США. При высеве лиофильно высушенной культуры 15 штамма на пептон-цистеиновый агар было получено 2 типа колоний – серые и голубые. Эксперименты на животных показали, что иммунизация бактериальной культурой, полученной из клона голубых колоний, защищала морских свинок от аэрозольного заражения штаммом *F. tularensis* подвида *tularensis*. Один из клонов голубых колоний, стал основой для получения вакцинного штамма *F. tularensis* LVS (Live Vaccine Strain), иммуногенные свойства которого аналогичны свойствам вакцины *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

У вакцинных штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *F. tularensis* LVS авирулентность генетически не детерминирована, поскольку, была достигнута путём многократных пассажей на синтетических средах. Следовательно, остается вероятность усиления вирулентности, что может привести к развитию инфекционного процесса при вакцинации. Помимо этого, иммунологические параметры, индуцированные вакцинацией штаммом *F. tularensis* LVS и

формирующие протективный противотуляремийный иммунитет, остаются неизвестными. Именно поэтому, а также в связи со сложностью стандартизации и высокими требованиями безопасности вакцинный штамм *F. tularensis* LVS не лицензирован и не одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) и используется только в качестве экспериментальной вакцины [89].

В России, согласно приказу Министерства здравоохранения РФ «Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям», обязательной вакцинации подлежат люди, которые относятся к группам риска, а именно: лица, проживающие в эндемичных по туляремии районах, а также прибывшие в эти районы, а также лица, выполняющие виды работ, связанные с сельским хозяйством, лесозаготовкой и непосредственной работой с живыми культурами возбудителя туляремии [21].

В связи со сложностью стандартизации и имеющейся реатогенностью живой туляремийной вакцины, а также вероятностью реактивации вирулентности используемого штамма большое количество исследований посвящено разработке альтернативных вакцин, не содержащих живых бактерий *F. tularensis*.

1.3 Альтернативные вакцины

Учитывая недостатки существующей живой туляремийной вакцины учёными были использованы различные стратегии в создании безопасного и эффективного вакцинного препарата. Наибольшее количество литературных данных посвящено разработке инактивированных и субъединичных вакцин.

Вакцина из убитых цельных клеток, самая ранняя вакцина, разработанная против туляремии и называемая вакциной «Foshay», была приготовлена из фенолизированной жидкой культуры [123, 124]. Несмотря на эффективную защиту приматов от заражения *F. tularensis* SchuS4 [106], вакцинный препарат «Foshay» продемонстрировал значительную токсичность, включая образование

некротических поражений. Кроме того, не было эффективной защиты у сотрудников лаборатории и в последующих контрольных испытаниях на животных [123, 124]. Более поздние попытки разработать инактивированную противотуляремию вакцину также имели неоднозначный успех.

Включение адьюванта Фрейнда в состав вакцинного препарата из инактивированных фенол-мертиолом штаммов *F. tularensis* LVS или *F. tularensis* SchuS4 не повышало эффективности вакцины [208]. Убитая нагреванием вакцина *F. tularensis* LVS, приготовленная с IL-12 и экспрессируемая в векторе на основе вируса вазиккулярного стоматита, генерировала усиленный клиренс туляремиальных бактерий по сравнению с неадьювантной вакциной [170]. В другом исследовании, интраназальная вакцинация инактивированным (параформальдегидом или ультрафиолетом) штаммом *F. tularensis* LVS в комбинации с IL-12 вызывала протективный иммунитет в 90 % случаев против заражения высокими дозами штамма *F. tularensis* LVS. Эта защита коррелировала с улучшением бактериального клиренса, уменьшением воспаления тканей и увеличением специфических IgG и IgA антител в сыворотке крови. Тем не менее, такая вакцинация оказалась неэффективной от заражения вирулентным штаммом *F. tularensis* SchuS4 [50]. Также Eyles и соавт. показали, что внутримышечная иммунизация мышей линии BALB/c штаммом *F. tularensis* LVS в комбинации в качестве адьюванта иммуностимулирующим комплексом (ISCOMS) или комплексом ISCOMS с олигонуклеотидами CpG, обеспечивала надежную защиту от аэрозольного заражения штаммом *F. tularensis* HN63 подвида *holarctica*, но данный вакцинный препарат не защищал от аэрозольного заражения низкими дозами штамма *F. tularensis* SchuS4 подвида *tularensis* [116].

Таким образом, инактивированные различными способами вакцинные препараты мало эффективны против аэрозольного заражения вирулентным штаммом *F. tularensis* SchuS4 подвида *tularensis*. Данные вакцинные препараты запускают гуморальное звено иммунитета, и вероятно, в связи с низким уровнем индукции клеточного звена иммунитета защита от высоковирулентных штаммов *F. tularensis* не эффективна.

Другим направлением является разработка вакцин на основе протективных антигенов *F. tularensis* – химических субъединичных вакцин. Создание вакцин на основе рекомбинантных субъединиц устраняет возможность реверсии, которая может возникнуть с живыми аттенуированными вакцинами, и значительно снижает вероятность токсичности, которая может возникнуть при вакцинации инактивированными вакцинными препаратами. Однако до настоящего времени не было идентифицировано ни одного белка *F. tularensis*, способного генерировать протективный иммунитет против *F. tularensis* подвида *tularensis* [260]. В экспериментах на животных было показано, что субъединичные вакцины, содержащие ЛПС *F. tularensis*, не формировали протективный иммунитет против вирулентных штаммов *F. tularensis* подвидов *tularensis* или *holartica* [87, 125].

Ряд исследований был посвящен разработке вакцины на основе О-антигена с адьювантом или химически конъюгированным бычьим сывороточным альбумином. Такая вакцинация усиливала защиту от заражения мышей авирулентным штаммом *F. tularensis* LVS, но не защищала от аэрозольного заражения вирулентными штаммами *F. tularensis* [40, 87].

Другие бактериальные компоненты были исследованы для использования в субъединичной вакцине, но также с ограниченным успехом. Иммунизация мышей поверхностным липопротеином Tul4 и белком теплового шока DnaK, в присутствии полусинтетического тритерпенового гликозидного адьюванта вызывало значительную защиту мышей от аэрозольного заражения штаммом *F. tularensis* LVS. Тем не менее, данных об эффективности этого подхода при заражении штаммом *F. tularensis* SchuS4 нет [41].

Таким образом, хотя многочисленные исследования были сосредоточены на идентификации антигенов *F. tularensis*, которые могли бы быть включены в субъединичную вакцину, на настоящий момент не обнаружено ни одного антигена *F. tularensis*, способного генерировать протективный иммунитет против *F. tularensis* подвида *tularensis*. Инактивированные, как и субъединичные вакцины, индуцируют преимущественно гуморальное звено и не способны к выраженной активации клеточного звена иммунитета. Неэффективность вакцинации данными

вакцинными препаратами связана с тем, что *F. tularensis* является внутриклеточным патогеном и антитела играют лишь вспомогательную роль, опсонизируя бактерии, когда бактерии находятся внеклеточно. Для формирования протективного противотуляремийного иммунитета необходимо, чтобы вакцина индуцировала как гуморальное, так и клеточное звено иммунитета.

1.4 Живые аттенуированные вакцины

В настоящий момент эффективную защиту против туляремии обеспечивают только живые вакцины на основе аттенуированных штаммов. Согласно литературным данным, наиболее перспективным направлением в разработке вакцины является конструирование ослабленных штаммов с генетически направленными мутациями. Полувековой опыт использования живой туляремийной вакцины на основе штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ и экспериментальной вакцины на основе штамма *F. tularensis* LVS, указывает на необходимость их совершенствования. Принято считать, что любой аттенуированный штамм, который рассматривается в качестве живой туляремийной вакцины, должен быть более безопасным, чем существующие вакцины на основе штаммов *F. tularensis* LVS и *F. tularensis* 15 НИИЭГ, и в то же время обеспечивать защиту, сопоставимую или более высокую, чем защита, обеспечиваемая существующими вакцинами от аэрозольного заражения вирулентными штаммами *F. tularensis* subsp. *tularensis* [146]. Применяемые для производства вакцин штаммы формируют длительный протективный иммунитет у людей против заражения штаммами *F. tularensis* subsp. *holarctica*, но недостаточный уровень защиты от аэрозольного заражения штаммами *F. tularensis* subsp. *tularensis* [146], характеризуются неясным механизмом аттенуации, генетической нестабильностью и относительно высокой реактогенностью [14, 23, 112]. В связи с высокой реактогенностью эти вакцины имеют ограничения по применению для людей с ослабленной иммунной системой и детей [14].

Многолетние исследования возбудителя туляремии позволили охарактеризовать метаболизм бактерий, выяснить механизмы их внутриклеточного размножения и реакции иммунной системы на патоген [146]. Успех данных исследований во многом был связан с разработкой генетических методов направленной модификации генома туляремиального микроба и с полногеномным секвенированием подвидов *F. tularensis*. Эти методы открыли также новые возможности для создания перспективных кандидатов в вакцинные штаммы. В исследованиях на экспериментальных животных и макрофагоподобных клеточных линиях выявлено, что вирулентность *F. tularensis* связана с их способностью реплицироваться в фагоцитарных клетках и это является необходимым условием для формирования проективного иммунитета, поэтому при разработке новых вакцин важно учитывать мутации в геноме аттенуированных штаммов, которые нацелены на ослабление размножения бактерий в макрофагах. Большое количество публикаций и наиболее интересные результаты были получены в результате делеции гена *iglC* и модификации гена *sod*. Продукт гена *iglC* - белок IgIC – относится к одному из факторов вирулентности *F. tularensis* и является компонентом транспортной системы типа VI, позволяющей бактериям *F. tularensis* проникать из фагосомы в цитозоль фагоцита [252]. В геномах всех подвидов *F. tularensis* присутствуют две копии гена *iglC*, входящих в состав двух копий «островов патогенности» [18]. Удаление одной копии гена *iglC* из штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ приводит к аттенуации бактерий, вероятно, за счет снижения способности бактерий размножаться в макрофагах [16].

Бактериальный фермент SodB является одним из белков семейства супероксид дисмутаза, защищающих микроорганизмы от продуктов метаболизма бактерий и окислительного взрыва фагоцитов [44]. Геном *F. tularensis* содержит одну копию гена *sodB*, удаление которой приводит к гибели бактерии. Модификация гена *sodB* путем внесения редких кодонов в начало гена бактерий штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *F. tularensis* LVS приводит к снижению их способности размножаться в макрофагах в результате замедления скорости синтеза SodB, что приводит к транзиторному снижению концентрации

супероксиддисмутаза В в бактериях в логарифмической фазе роста. Модифицирование штаммов по гену *sodB* приводило к усилению их протективных свойств в модельных экспериментах на мышах линий C57Bl/6 и BALB/c по сравнению с исходными штаммами *F. tularensis* LVS и *F. tularensis* 15 НИИЭГ [31, 43].

Выявленные множественные гомологичные повторы в геномах *F. tularensis* являются одной из основных причин нестабильности штаммов, используемых для производства вакцин, что обусловлено возникновением делеций в хромосоме в результате рекомбинации ДНК. Одним из ключевых белков системы гомологичной рекомбинации у бактерий *F. tularensis* является *recA*. Делеция гена *recA* приводит к подавлению гомологичной рекомбинации в клетках *F. tularensis* не влияя на их рост *in vitro* и размножение в макрофагах [19], а также снижало вероятность восстановления второй копии *iglC* и стабилизировало геном.

1.5 Иммунный ответ против *Fransicella tularensis*

1.5.1 Врожденный иммунный ответ

Врожденные и адаптивные иммунные реакции тесно связаны в процессе формирования защитного иммунитета против патогенных микроорганизмов [144]. Врожденная иммунная система представляет собой первую линию защиты хозяина от патогенов и распознает эволюционно консервативные структуры микроорганизмов, называемые патоген-ассоциированными молекулярными образцами – PAMP (pathogen-associated molecular patterns), а распознающие их рецепторы – образраспознающими рецепторами – PRR (pattern-recognition receptors) [35]. Семейство Toll-подобных рецепторов является наиболее обширной группой PRR-рецепторов. Toll-подобные рецепторы – интегральные мембранные белки I типа, распознающие такие PAMP как липополисахарид (TLR4), бактериальные липопроотеины (TLR2), флагеллин (TLR5), ДНК CpG (TLR9) и другие [211].

Помимо TLR клетки имеют также другие мембраносвязанные и цитозольные рецепторы, которые могут распознавать бактерии *F. tularensis*. Среди них рецепторы комплемента, рецепторы лектина С-типа и рецепторы Fc γ (Fc γ R) на клеточной мембране, а также цитозольные NOD-подобные рецепторы (NLR) и интерферон-индуцибельный белок AIM2. Вышеуказанные рецепторы характерны не только для фагоцитирующих, но и эпителиальных и эндотелиальных клеток.

Первоначальное взаимодействие *F. tularensis* с клеточной поверхностью происходит через TLR и/или другие мембраносвязанные рецепторы, что приводит к активации клетки по MyD88-зависимому сигнальному пути [273]. NLR рецепторы и белок AIM2 представляют собой наиболее важные компоненты распознавания *F. tularensis* в цитозоле [154, 190], где далее воспалительный адаптерный белок ASC взаимодействует с прокаспазой-1. Активация прокаспазы-1 осуществляется в составе инфламмосомы – временной надмолекулярной структурой, включающей в себя неактивную прокаспазу-1 и NLR рецепторы. В результате происходит активация транскрипционного фактора NF- κ B, что приводит к секреции провоспалительных цитокинов таких как IL-1 β и IL-18 [120, 162].

Как и любая грамотрицательная бактерия *F. tularensis* имеет ЛПС в качестве доминирующего компонента клеточной стенки. Однако ЛПС *F. tularensis* имеет ряд своих особенностей, которые приводят к измененным реакциям врожденного иммунитета [209]. Обычно ЛПС грамотрицательных бактерий распознается TLR4/MD2 и вызывает сильный провоспалительный эффект [186]. Однако в ряде работ [37, 134, 238, 261] было показано, что очищенный ЛПС *F. tularensis* обладает слабой биологической активностью. Ограниченная способность ЛПС *F. tularensis* передавать сигнал через TLR4 рецептор скорее всего зависит от структурных свойств фрагмента липида А, связанных с числом и длиной заместителей ацильной цепи и отсутствием фосфатных фрагментов [186]. Было также показано, что распознавание через TLR4 не способствует устойчивости мышей к аэрозольной инфекции *F. tularensis* типа А и внутрикожной инфекции, вызванной штаммом LVS [71]. Тем не менее, другие компоненты *F. tularensis* могут связываться с

рецептором TLR4. Например, рекомбинантный белок теплового шока DnaK индуцировал через TLR4 созревание дендритных клеток, выделенных из костного мозга мышей, что было продемонстрировано активацией костимулирующих молекул (CD40, CD80 и CD86), и продукцией таких цитокинов как IL-6, TNF- α , IL-12 p40 и IL-10 [42]. Таким образом, можно сделать вывод, что TLR4 участвует в распознавании *F. tularensis* как корецептор и может модулировать сигнальные пути через TLR2 рецептор.

В течение первого десятилетия XXI века появилось все больше сообщений о том, что TLR2 участвует в распознавании *F. tularensis* врожденной иммунной системой мышей. У мышей, нокаутных по TLR2 гену при интраназальном заражении сублетальной дозой LVS *F. tularensis* наблюдается высокая бактериальная нагрузка, меньшая выживаемость и низкий уровень синтеза IL-6 и TNF- α по сравнению с мышами дикого типа линии C57BL/6 [189]. Дальнейшие исследования подтвердили, что TLR2 рецептор мышинных макрофагов и дендритных клеток играет важную роль в распознавании *F. tularensis*, активируя антигенпрезентирующие функции фагоцитов и контролируя транскрипцию генов провоспалительных цитокинов [79, 149, 174]. На модели туляремии инфекции в других исследованиях было продемонстрировано, что молекулярный комплекс TLR2/MyD88 (передача сигналов через IRAKs) незаменим для активации NF- κ B, инициирующей продуцирование макрофагом провоспалительных цитокинов, и, следовательно, защитных врожденных иммунных ответов у мышей после заражения аттенуированным, а также вирулентным штаммами *F. tularensis* [34, 77, 81, 234].

Присутствие белков опсонинов играет также важную роль на ранних фазах взаимодействия *F. tularensis* с клетками врожденной иммунной системы и изменяет внутриклеточную судьбу бактерий [98]. Участие в этом процессе опсонофагоцитарных рецепторов изменяет внутриклеточное перемещение бактерий *F. tularensis* путем модуляции фагоцитарных путей, которые ограничивают выход бактерий из фagosомы и их внутриклеточное размножение. Поверхностные рецепторы иммунных клеток, такие как: рецептор маннозы, один

из рецепторов лектина С-типа [45, 245], рецепторы комплемента CR3 (CD11b/CD18) макрофагов [45, 75, 126], CR4 (CD11c/CD18) дендритных клеток [52], CR1/2 В-клеток [217] и Fcγ-рецепторы [45, 126] участвуют в интернализации *F. tularensis* в клетку-хозяина.

Опсонизация сывороткой, содержащей антитела к *F. tularensis* Schu S4, переориентирует взаимодействие бактерий с макрофагами с рецептора маннозы на рецептор комплемента CR3, с рецептора-мусорщика А на FcγR-рецептор. В свою очередь, CR3-опосредованный фагоцитоз *F. tularensis* снижает выход туляремиальных бактерий из фагосомы, а Fcγ-опосредованный фагоцитоз приводит к интенсивной продукции супероксида в ранней фагосоме, NADPH-оксидаз-зависимому окислительному взрыву и ограниченному выходу бактерий из фагосомы [126]. Следует отметить, что в ряде исследований также было показано, что бактерии *F. tularensis* способны использовать иммунные реакции врожденного иммунитета в своих целях. В частности, благодаря особенностям строения О-антигена, структурной части ЛПС *F. tularensis*, которая взаимодействует с производными белками-опсонинами ключевого компонента системы комплемента С3, усиливается фагоцитарная активность клеток, что способствует их интенсивному проникновению внутрь и дальнейшей внутриклеточной репликации [52, 53, 74, 75, 215, 243, 265]. Эта стратегия уклонения от реакций системы комплемента является одной из детерминант вирулентности *F. tularensis* и помогает им проникнуть внутрь фагоцитов, где они успешно размножаются.

Таким образом, проникновение *F. tularensis* в клетки макроорганизма может осуществляться путем поглощения неопсонизированных, либо опсонизированных бактерий. Такая сложная активация нескольких сигнальных путей влияет на результат взаимодействия бактерий *F. tularensis* и клеток врожденной иммунной системы. Эти факты следует учитывать при разработке экспериментальных систем инфицирования клеток *in vitro*.

В клетке-хозяина (в основном были изучены макрофаги и дендритные клетки) *F. tularensis* находится внутри фагосомы, образовавшейся путем погружения и замыкания клеточной мембраны. В фагосоме экспрессируются

ранние и поздние эндосомные маркеры, такие как EEA-1, LAMP-1 и Rab-7, но не маркер катепсин D, который является индикатором слияния фагосомы с лизосомой [76, 240]. Следующим шагом во внутриклеточном перемещении бактерии является активное разрушение мембраны фагосомы с последующим уходом в цитозоль, где она затем активно реплицируется [76, 128]. До сих пор ведутся споры о том, происходит ли подкисление фагосомы до разрушения мембраны бактериями *F. tularensis*. Существуют исследования, в которых продемонстрировано прогрессирующее закисление вакуоли за счет экспрессии V-АТФазы до разрушения мембраны фагосомы [72, 239], а также противоречивые данные, исключаящие подкисление фагосомы [58, 76, 223]. Пока не ясно, связано ли это несоответствие с разными экспериментальными условиями или разными штаммами *F. tularensis*. Выход из фагосомы сопровождается активной репликацией в цитозоле и запрограммированной гибелью фагоцитов [141, 167].

Макрофаги и дендритные клетки

Вирулентность *F. tularensis* долгое время связывалась со способностью бактерий реплицироваться в фагоцитарных клетках макроорганизма. Проведено много исследований, целью которых была оценка способности штаммов *F. tularensis* размножаться в макрофагах и дендритных клетках различных тканей макроорганизма. Бактерии *F. tularensis* при заражении *in vitro* способны размножаться в перитонеальных, альвеолярных макрофагах, дендритных клетках крыс, мышей и морских свинок, а также в моноцитах периферической крови человека и полученных из моноцитов дендритных клетках [39, 52, 59, 60, 61, 68, 69, 135, 149, 218]. В экспериментах по заражению фагоцитов *in vitro* было показано, что при отсутствии экзогенных факторов активации клеток, например INF- γ , внутриклеточная репликация штамма *F. tularensis* LVS продолжается неограниченно до гибели клетки-хозяина, а именно каспазо 3-зависимому апоптозу клеток [166, 167]. Хотя подобных экспериментов по заражению штаммом *F. tularensis* LVS *in vivo* проведено не было, из литературных данных известно, что вирулентный штамм *F. tularensis* SchuS4 подвида *tularensis* индуцирует каспазо-3-зависимый апоптоз резидентных макрофагов мыши. Таким образом,

неограниченный рост *F. tularensis* вызывает апоптоз инфицированных клеток как *in vivo*, так и *in vitro* [274].

В исследовании на макрофагах, полученных от людей и мышей, было показано, что *F. tularensis* проникает в фагоциты и быстро покидает фагосому, размножаясь в цитозоле, тем самым избегая слияния фагосомы с лизосомой и связанные с этим последующие бактерицидные эффекты [180]. Обработка инфицированных макрофагов *ex vivo* IFN- γ подавляет внутриклеточный рост *F. tularensis*. В макрофагах, полученных из моноцитов периферической крови людей и обработанных IFN- γ , наблюдался контроль роста штамма *F. novicida*, так как IFN- γ нарушал способность бактерий уклоняться от слияния фагосомы с лизосомой [240]. Эти данные показывают, что предотвращение выхода *F. tularensis* из фагосомы является одним из механизмов, с помощью которого IFN- γ ингибирует внутриклеточный рост этих бактерий. Однако более поздние исследования, в которых изучался рост штаммов *F. tularensis* LVS и *F. tularensis* SchuS4 в макрофагах костного мозга мышей и в макрофагоподобной клеточной линии J774.1, показали, что IFN- γ -опосредованная активация клеток не влияет на выход бактерий из фагосомы [58, 105]. Вероятно, эти расхождения связаны с тем, что в вышеупомянутых исследованиях были взяты макрофаги разного происхождения, а также штаммы *F. tularensis* разных подвидов.

Индукцированная IFN- γ активация клеток приводит к предотвращению выхода бактерий *F. tularensis* из фагосомы, однако это не является единственным механизмом, с помощью которого IFN- γ ограничивает рост бактерий внутри фагоцитов. Генерация активных форм кислорода и азота – это два хорошо известных механизма, опосредованных IFN- γ , которые могут подавлять рост внутриклеточных патогенов. Несколько исследований были сосредоточены на определении роли этих двух классических механизмов в контроле роста *F. tularensis* как *in vitro*, так и *in vivo* [180, 181, 182]. Следовательно, индуцированные IFN- γ бактерицидные механизмы, участвующие в ингибировании роста высоковирулентного штамма *F. tularensis* SchuS4 в активированных макрофагах, еще предстоит полностью выяснить, в то время как менее

вирулентный штамм *F. tularensis* LVS более чувствителен к таким бактерицидным эффектам.

Высоковирулентные штаммы *F. tularensis* способны подавлять активацию фагоцитов и продукцию ими провоспалительных цитокинов. Так, штамм *F. tularensis* SchuS4 подвида *tularensis* способен подавлять синтез IFN- γ фагоцитами, способствуя к выработке инфицированными клетками простагландина-E₂ (PGE₂), который ингибирует синтез IFN- γ [279]. Вирулентные штаммы *F. tularensis* также активно подавляют активацию дендритных клеток человека и мыши, также нарушая синтез провоспалительных цитокинов [59, 68]. Это обусловлено тем, что вирулентный штамм SchuS4 способен увеличивать продукцию иммуносупрессивного цитокина TGF- β (индикатор альтернативной активации макрофагов), а также подавлять экспрессию CD14 дендритными клетками легких [59, 69].

Таким образом, *F. tularensis* взаимодействуя с рецептором комплемента на поверхности макрофага блокирует его активацию, и как следствие, окислительный взрыв. После образования фагосомы *F. tularensis* покидает ее, избегая слияния фагосомы с лизосомой. Попадая в цитозоль инфицированной клетки, *F. tularensis* вызывает пироптоз – форму апоптоза, которая приводит к высвобождению бактерий из клетки [47, 75]. После того, как *F. tularensis* покидает макрофаг или другую инфицированную клетку, бактерии быстро инфицируют другую или фагоцитируются другими профессиональными фагоцитами. В свою очередь, дендритные клетки служат не только нишей для репликации *F. tularensis*, но также переносят патоген в лимфатические узлы, играя важную роль в раннем распространении инфекции [46].

Нейтрофилы

Другой важной популяцией клеток врожденной иммунной системы, которая одна из первых реагирует на инфекцию являются нейтрофилы. Нейтрофилы являются ключевыми клетками врожденного иммунитета, которые генерируют активные формы кислорода, катионные пептиды и разрушающие ферменты для уничтожения патогенов. В частности, многокомпонентный фермент НАДФН-

оксидаза, катализирующий превращение молекулярного кислорода в супероксид-анионы, является основным противомикробным оружием в арсенале нейтрофилов. Интересно, что хотя штаммы *F. tularensis* LVS и *F. tularensis* SchuS4 легко фагоцитируются нейтрофилами человека, бактерии ингибируют сборку НАДФН-оксидазы [194, 195]. Также бактерии *F. tularensis* способны размножаться и в нейтрофилах [194]. Следовательно, нейтрофилы как макрофаги и дендритные клетки, служат нишей для репликации *F. tularensis*. Тем не менее, в других исследованиях показано, что истощение популяции нейтрофилов у мышей приводит к высокой восприимчивости к парентеральной туляремийной инфекции [86, 109, 251]. Несмотря на активное размножение бактерий *F. tularensis* в нейтрофиллах, данные клетки сохраняют способность секретировать цитокины и хемокины, которые, в свою очередь, привлекают другие важные эффекторные клетки к очагу инфекции [93]. На модели легочной инфекции было показано, что истощение популяции нейтрофилов у мышей приводило лишь к незначительному увеличению бактериальной нагрузки в печени [86]. В другом исследовании показано, что нейтрофилы составляют до 50 % клеток, инфицированных *F. tularensis* в легких у мышей через 3 дня после заражения штаммами *F. tularensis* LVS или *F. tularensis* SchuS4 [133]. Однако чрезмерное привлечение нейтрофилов в легкие, по-видимому, способствует более выраженному течению инфекции.

Так, у мышей дефицитных по матриксной металлопротеиназе-9, которая генерирует нейтрофильные хемоаттрактанты привлекающие нейтрофилы в очаг инфекции, наблюдалось снижение бактериальной нагрузки во время легочной инфекции, вызванной штаммом *F. tularensis* LVS, что приводило к увеличению выживаемости по сравнению с мышами дикого типа [188]. Таким образом, нейтрофилы играют неоднозначную роль при туляремийной инфекции.

Тучные клетки

В ряде работ показано активное участие тучных клеток в иммунном ответе на *F. tularensis*. Мыши, у которых была истощена популяция тучных клеток, были более восприимчивы к легочной инфекции, вызванной штаммом *F. tularensis* LVS,

и у них наблюдалась сниженная продукция IL-4 в легких, в сравнении с мышами без иммунодефицита [151]. В другом исследовании было показано, что тучные клетки *in vitro* ингибируют рост штамма *F. tularensis* LVS внутри макрофагов посредством синтеза IL-4 [229].

NK клетки

В нескольких исследованиях было показано, что мыши с дефицитом NK-клеток имеют аналогичную восприимчивость к интраназальному и интрадермальному инфицированию штаммом *F. tularensis* LVS, как и мыши дикого типа [57, 103, 183]. Тем не менее, NK-клетки являются важными продуцентами IFN- γ во время первичной интрадермальной или интраназальной иммунизации штаммом *F. tularensis* LVS. В течение первых дней после иммунизации штаммом *F. tularensis* LVS субпопуляция NK-клеток с фенотипом CD11b⁺DX5⁺NK1.1⁺ продуцировала IFN- γ в легких и печени в случае интраназального пути введения штамма [57, 183], тогда как при интрадермальном пути введения бактерий наблюдался синтез IFN- γ данной субпопуляцией NK-клеток в селезенке и печени мышей [102]. Кроме этого, продукция IFN- γ NK-клетками имела решающее значение для образования гранулемы печени вовремя интраназальной инфекции, вызванной штаммом *F. tularensis* LVS; истощение популяции NK-клеток не приводило к гибели мышей, но вызывало дефект гранулем, которые хуже сдерживали инфекцию [57]. Таким образом, NK-клетки играют роль в раннем периоде иммунного ответа, синтезируя IFN- γ совместно с другими клетками врожденной иммунной системы [102]. Bokhari et al. в своем исследовании выявили, что у мышей, дефицитных по NK-клеткам вовремя интраназальной туляремийной инфекции наблюдалось снижение на 50 % уровня IFN- γ в сыворотке по сравнению с мышами дикого типа [57].

1.5.2 Адаптивный иммунный ответ

Выяснение механизмов специфической защиты от внутриклеточных патогенов имеет решающее значение для успешной разработки новых вакцин. Адаптивные иммунные реакции обычно развиваются в течение более длительного

периода времени, чем врожденный иммунитет, так как для них сначала требуется активация и клональная экспансия антиген-специфических В- и Т-клеток. Образующиеся в результате этого Т- и В-клетки памяти быстро реагируют на повторное воздействие специфического антигена, тем самым формируя основу протективного поствакцинального иммунитета.

В-клетки

В-клетки хорошо известны своей способностью дифференцироваться в плазматические клетки, секретирующие антитела в ответ на чужеродные антигены. Туляремиальная инфекция индуцирует синтез специфических антител против антигенов *F. tularensis* как у мышей, так и у человека [160, 161, 145]. В основном антитела вырабатываются против ЛПС *F. tularensis*, но в литературе описаны и другие иммуногенные белки внешней мембраны, такие как ForA и OmpA, и внутриклеточные белки, такие как GroEL и KatG [157].

В ряде исследований выявлено, что антитела к ЛПС *F. tularensis* обеспечивали протективный эффект против летального внутрикожного и внутрибрюшинного заражения штаммом *F. tularensis* LVS [97, 125, 225, 246, 258]. В другом исследовании было показано, что ранняя защита после заражения была опосредована полиспецифическими антителами IgM против компонентов ЛПС *F. tularensis* [78].

Внутрикожная вакцинация штаммом *F. tularensis* LVS не обеспечивает защиты от интраназального заражения, в свою очередь, интраназальная иммунизация защищает мышей от подкожного и интраназального заражения вирулентными штаммами *F. tularensis*. Это указывает на возможное участие IgA слизистой оболочки в формировании протективного противотуляремиального иммунитета [85, 280]. IgA был обнаружен в сыворотке крови людей и мышей, а также в бронхолегочном лаваже вакцинированных мышей [161, 170, 224].

Ранние методы изучения противотуляремиального иммунитета были сосредоточены на исследованиях, основанных на переносе иммунной сыворотки интактным животным [158]. У мышей перенос иммунной сыворотки показывает некоторую защиту от легочной инфекции, вызванной низковирулентными

штаммами *F. tularensis* LVS и *F. novicida* [157, 184, 212]. Перенос сыворотки от животных, иммунизированных штаммом *F. tularensis* LVS, не обеспечивает защиту от легочной инфекции, вызванной штаммом *F. tularensis* SchuS4 у мышей линии BALB/c [155]. В другом исследовании было показано, что сыворотка от мышей BALB/c, инфицированных *F. tularensis* LVS и вылеченных левофлоксацином, обладала протективным эффектом [159]. Защита в результате переноса иммунной сыворотки была получена благодаря Fc γ R-опосредованному фагоцитозу, а также от антитело-зависимой цитотоксичности NK-клеток [158, 237]. Важно отметить, что протективный эффект перенесенной сыворотки зависит от иммунных ответов Т-клеток как у мышей, так и у крыс [157, 191]. Следовательно, защита являлась следствием ответа наивных Т-клеток.

Наличие специфических к антигенам *F. tularensis* антител является индикатором предшествующего вакцинального или инфекционного процесса [242, 243]. Однако, как патоген, который реплицируется внутриклеточно, *F. tularensis* обычно недоступна для антител, но при обнаружении вне инфицированной клетки антитела могут играть определенную роль в борьбе с инфекцией посредством опсонизации и облегчения фагоцитоза бактерий [122]. Кроме того, В-клетки играют важную, независимую от антител роль в качестве АПК и/или продуцентов цитокинов [107, 143, 277]. В-клетки являются основными продуцентами цитокинов, таких как IL-10, IL-6 и TNF- α , а также продуцируют другие цитокины, такие как IFN- γ , IL-4, IL-2 и IL-12 [137]. Согласно литературным данным, В-клетки могут дифференцироваться в отдельные «регуляторные» и «эффекторные» подмножества, продуцирующие цитокины, которые, по сообщениям некоторых авторов [137, 264], могут регулировать активность и функцию других типов клеток, таких как Т-клетки. Регуляторные В-клетки продуцируют IL-10 и имеют решающее значение в угнетении патологических процессов. Подгруппа эффекторных В-клеток подразделяется на Be-1 (продуцирующие IFN- γ) и Be-2 (продуцирующие IL-4) клетки [136, 138]. Дифференцировка В-клеток в Be-1 или Be-2 субпопуляции зависит от родственного взаимодействия с Т-клетками типов Th1 и Th2, соответственно. Интересно, что эти подмножества В-клеток могут

взаимодействовать с наивными CD4⁺ Т-клетками и праймировать их в Th1 или Th2 иммунорегуляторную ветвь приобретенного иммунного ответа [264]. С другой стороны, в работе [185] показано, что В-клетки, праймированные Th1-клетками, на модели мыши и человека секретировали IFN- γ . Напротив, В-клетки, праймированные Th2-клетками секретировали IL-2, IL-4 и IL-13. И наконец, регуляторные В-клетки [281] продуцируют IL-10 после стимуляции комбинациями антигена и CD40L.

Таким образом, В- и Т-клетки взаиморегулируют свои функции не только за счёт основных (презентация антигена и синтеза специфических антител), но и посредством продукции цитокинов, играющих важную роль в дифференцировке данных субпопуляций, и как следствие, в генерации Th-направленности и формировании адаптивного иммунного ответа.

Считается, что формирование первичного и вторичного иммунных ответов против *F. tularensis* опосредовано иммунорегуляторной ветвью иммунной системы Th1 типа. С другой стороны, была продемонстрирована важность участия В-клеток в первичном и вторичном иммунном ответе [107]. Более того, было выявлено, что ранний протективный иммунитет, начиная с третьего дня после иммунизации штаммом *F. tularensis* LVS, зависит от наличия В-клеток и сопутствующего синтеза IFN- γ [97].

Общепринято, что влияние В-клеток на защиту от туляремиальной инфекции варьируется между бактериальными штаммами с низкой и высокой вирулентностью [93, 108]. Исследование, направленное на определение критериев защиты от высоковирулентного штамма *F. tularensis* SchuS4 показало, что выживаемость мышей после первичной инфекции коррелировала с наличием $\alpha\beta$ и $\gamma\delta$ Т-клеток, а также В-клеток [96]. Следовательно, В-клетки могут модулировать специфические иммунные реакции посредством не только продукции антител, но и синтеза цитокинов, а также посредством прямых контактов с другими иммунокомпетентными клетками [270].

Таким образом, анализ титров специфических антител является простой мерой определения напряженности гуморального иммунитета, однако разработка

критериев оценки иммунологической эффективности вакцинации должна быть сосредоточена на понимании механизмов реализации эффекторных функций Т- и В-клеток.

Т-клетки

При внутриклеточных инфекциях $\alpha\beta$ Т-клетки играют ключевую роль в адаптивном иммунном ответе, опосредуя клеточный иммунитет и организуя иммунный ответ в целом [55, 110]. У мышей, лишенных $\alpha\beta$ Т-клеток, инфицирование штаммом *F. tularensis* LVS приводит к хронической инфекции и летальному исходу [109, 111, 282].

В составе $\alpha\beta$ Т-клеток выделяют две основных субпопуляции: $CD4^+$ (Т-хелперы) и $CD8^+$ (цитотоксические Т-лимфоциты). Согласно литературным данным, протективный поствакцинальный и постинфекционный иммунитет формируется именно за счёт активного участия $CD4^+$ и $CD8^+$ $\alpha\beta$ Т-клеток [70, 85, 191, 228, 278, 282]. Истощение $CD4^+$ или $CD8^+$ субпопуляции $\alpha\beta$ Т-клеток у иммунных мышей линий BALB/c и C57BL/6 приводит к летальному исходу с небольшими различиями в продолжительности жизни. Так, иммунные мыши линии BALB/c, дефицитные по $CD4^+$ или $CD8^+$ Т-клеткам имеют одинаковую продолжительность жизни, тогда как мыши C57BL/6, дефицитные по $CD4^+$ Т-лимфоцитам гибнут значительно быстрее, чем животные, дефицитные по $CD8^+$ Т-клеткам [85, 228]. Результаты этих исследований показывают, что оба подмножества $\alpha\beta$ Т-клеток необходимы для формирования протективного противотуляремиального иммунитета.

В литературе также встречаются данные о других малых субпопуляциях Т-клеток, которые вносят определенный вклад в формирование протективного иммунитета против *F. tularensis*. К таким субпопуляциям относятся $\gamma\delta$ Т-лимфоциты и дважды отрицательные ($CD4^-CD8^-$) $\alpha\beta$ Т-клетки. В то время как $CD4^+$ и $CD8^+$ $\alpha\beta$ Т-клетки имеют ключевое значение при первичной и вторичной туляремиальной инфекции у мышей и людей, участие $\gamma\delta$ Т-клеток не является обязательным в иммунном ответе при моделировании экспериментальной туляремии на модели мыши. $\gamma\delta$ TCR^{-/-} мыши восприимчивы к первичной

интраназальной или внутрикожной инфекции, вызванной штаммом *F. tularensis* LVS в равной степени, как и мыши дикого типа [193]. Однако в исследовании на людях было показано, что в крови переболевших туляремией людей значительно увеличивалась содержание субпопуляции $\gamma\delta$ T-клеток через 1 месяц после заражения [219]. $\gamma\delta$ T-клетки, полученные из периферической крови переболевших доноров способны контролировать репликацию штамма *F. tularensis* LVS посредством IFN- γ -зависимого механизма [233]. Следовательно, $\gamma\delta$ T-клетки вносят определенный вклад в формирование адаптивного иммунного ответа против *F. tularensis*.

Также показано, что $CD4^-CD8^- \alpha\beta$ T-клетки принимают участие в формировании противотуляремийного иммунитета. Данная субпопуляция характеризуется отсутствием экспрессии CD4 и CD8 молекул. $CD4^-CD8^- \alpha\beta$ T-клетки преимущественно локализуются в легких мышей, иммунизированных интраназально, способствуют дифференцировке моноцитов в дендритные клетки и поддерживают иммунный ответ $CD4^+$ и $CD8^+$ $\alpha\beta$ T-клеток [197, 198].

Основной целью любой вакцинации является индукция клеток памяти. Иммунологическая память – результат клональной экспансии и дифференцировки антиген-специфических лимфоцитов, которые сохраняются длительное время или на протяжении всей жизни. Лимфоциты памяти обеспечивают немедленную защиту периферических тканей и увеличивают иммунный ответ на антигены во вторичных лимфоидных органах [32]. После первичной встречи с *F. tularensis* и угасания эффекторной фазы иммунного ответа антиген-специфические $CD4^+$ и $CD8^+$ T-клетки дифференцируются в клетки памяти. Среди T-клеток памяти выделяют T_{CM} и T_{EM} , осуществляющие иммунную реакцию при повторной встрече с антигенами *F. tularensis*.

T_{CM} клетки экспрессируют на своей поверхности CD62L, рецептор, который необходим для экстравазации клеток через эндотелий сосудов и миграции во вторичные лимфоидные органы, имеют высокую чувствительность к антигенной стимуляции, менее зависимы от костимуляции, повышают уровень экспрессии CD40L, что обеспечивает эффективную стимуляцию дендритных клеток и В-

клеток. Субпопуляция T_{CM} клеток имеют слабо выраженную эффекторную функцию, но легко пролиферируют и дифференцируются в T_{EM} клетки в ответ на антигенную стимуляцию, и синтезируют IFN- γ или IL-4. Немедленная защита обеспечивается T_{EM} клетками, которые мигрируют в очаги воспаления и проявляют свою эффекторную функцию посредством синтеза цитокинов и цитотоксического эффекта [236].

Выявление эффекторных функций, необходимых для борьбы с инфекцией, является важным аспектом разработки вакцины. Т-клетки периферической крови выздоравливающих людей продуцируют IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-17 и IL-22, что указывает на то, что синтез этих цитокинов индуцируется естественной инфекцией или вакцинацией, и поэтому необходимо оценивать их роль в формировании защитного иммунитета на животных в экспериментах по изучению иммуногенных и протективных свойств новых вакцинных штаммов [113, 115, 148, 213, 235].

Несколькими группами исследователей на мышинной модели также было показано, что для формирования протективного иммунитета необходимо наличие классических Th1-цитокинов, таких как IFN- γ и TNF- α [81, 82, 96, 172, 227, 254]. Потребность в обоих провоспалительных цитокинах для контроля инфекции указывает на то, что для формирования протективного иммунитета необходимы полифункциональные Т-клетки, продуцирующие два и более цитокина. IL-17A также продуцируется $CD4^+$, дважды отрицательными $CD4^-CD8^-$ и $\gamma\delta$ Т-клетками во время легочной инфекции мышей, инфицированных штаммом LVS, но отсутствует при подкожном заражении животных [94, 193, 279]. Несколькими группами ученых было показано, что IL-17A имеет важное значение именно во время первичной респираторной инфекции, вызванной штаммом LVS: мыши дефицитные по IL-17A были более восприимчивы к легочной инфекции в сравнении с мышами дикого типа [94, 178, 193, 227, 254, 279].

Таким образом, на сегодняшний день достигнут значительный прогресс в понимании вовлеченности разных субпопуляций лимфоцитов в иммунный ответ против *F. tularensis*, однако клеточные механизмы, лежащие в основе

формирования защитного противотуляремийного иммунитета и определяющие длительность остаются малоизученными.

1.6 Современные представления о корреляции между защитой организма от *F. tularensis* и специфическими иммунологическими показателями

Большинство применяемых вакцин в мире были разработаны эмпирически, с ограниченным пониманием их иммунологических механизмов действия. На сегодняшний день известно, что вид вакцины оказывает прямое влияние на тип запускаемых эффекторных лимфоцитов, которые опосредуют протективный иммунитет. Иммунизация инактивированными и субъединичными вакцинами индуцирует преимущественно гуморальный иммунный ответ. Недостатком данных типов вакцин является их низкая эффективность в индукции клеточного иммунного ответа, а именно формировании пулов специфических Т-хелперов Th1 типа и CD8⁺ Т-клеток, поэтому их применение для профилактики туляремии иррационально [250].

Для формирования протективного иммунитета против внутриклеточных инфекций необходимо, чтобы вакцинация индуцировала весь спектр адаптивных иммунных реакций, опосредованных В-клетками, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетками [226]. Способность *F. tularensis* размножаться в цитозоле дендритных клеток и макрофагов играет решающую роль в патогенезе и формировании протективного иммунитета, поэтому эффективную защиту против туляремии обеспечивают преимущественно живые вакцины, полученные на основе аттенуированных штаммов *F. tularensis* [113]. Иммунизация живой вакциной индуцирует эффективную презентацию антигена в составе молекулы МНС-I инфицированной АПК через TCR и корецептор CD8⁺ Т-клеткам, что приводит к их активации и последующей дифференцировке в антиген-специфические цитотоксические Т-лимфоциты [32, 250]. Поэтому цитотоксический вариант клеточного иммунного

ответа является адекватной формой иммунной защиты против *F. tularensis* и для его формирования необходима репликация туляремиального микроба в фагоцитах.

Т-клетки являются гетерогенной популяцией лимфоцитов, и их функциональная активность опосредуется различными механизмами, поэтому оценка Т-клеточного ответа является технически сложной задачей. Спектр функций Т-клеток включает способность пролиферировать или вызывать пролиферацию других клеток, организовывать иммунный ответ путем секреции хемоаттрактантов или экспрессии хемокиновых рецепторов, выполнять эффекторные функции путем цитолиза инфицированных клеток или секреции цитокинов. Все эти функции могут быть выражены в сложных комбинациях, которые и определяют эффективность Т-клеточного ответа. В настоящее время многопараметрическая проточная цитометрия является единственным методом, который может одновременно охарактеризовать несколько функций и позволяет оценивать фенотипы, стадии дифференцировки и функциональную активность Т-клеток [249].

Т-клетки, в особенности Т-хелперы, продуцируют большое количество цитокинов, поэтому клеточный иммунитет против *F. tularensis* оценивают на основании спектра продуцируемых цитокинов [226]. Определение уровня IFN- γ долгое время было основным критерием оценки эффективности иммунизации туляремиальными вакцинами [113]. Было показано, что IFN- γ играет важную роль в элиминации *F. tularensis* [235], однако в других исследованиях было выявлено, что наличие одних IFN- γ -продуцирующих клеток недостаточно [226, 261]. Другим цитокином, эффекторная функция которого заключается в уничтожении *F. tularensis*, является TNF- α [92]. Также было показано, что увеличение содержания обоих цитокинов IFN- γ и TNF- α после вакцинации *F. tularensis* LVS приводит к формированию более напряженного иммунитета и быстрой элиминации *F. tularensis* [225, 226, 235]. Третьим важным цитокином при оценке Т-клеточного иммунного ответа является IL-2. IL-2 не обладает прямой эффекторной функцией, но является основным цитокином, индуцирующим антигензависимую пролиферацию всех субпопуляций Т-клеток и может усиливать

активность NK-клеток [32, 249]. Также аутокринная или индуцируемая Т-хелперами IL-2-зависимая пролиферация имеет решающее значение для дифференцировки антигенспецифических CD8⁺ Т-клеток и формирования Т-клеточной памяти [249]. Таким образом, одновременное определение продукции IFN- γ , TNF- α и IL-2 является более информативным для оценки протективности противотуберкулезного Т-клеточного иммунитета, и указывает на то, что вакцинный штамм должен индуцировать генерацию полифункциональных Т-клеток. Роль полифункциональных Т-клеток в обеспечении защиты от других внутриклеточных инфекций хорошо изучена [33, 56, 100]. В исследованиях по изучению туберкулезной инфекции было показано, что CD69 молекула является не только маркером ранней активации клеток и участвует в регуляции эффекторной функции лимфоцитов, но и экспрессируется на специфических к *Mycobacterium tuberculosis* Т-хелперах [175] и цитотоксических Т-лимфоцитах [176], одновременно продуцирующих IFN- γ , TNF- α и IL-2, то есть CD69 является также маркером полифункциональных Т-клеток. Работы, посвященные изучению роли полифункциональных Т-клеток в формировании поствакцинального иммунитета к *F. tularensis*, не многочисленны [113]. Следовательно, необходимо оценить роль антиген-специфических полифункциональных Т-клеток и уровень экспрессии CD69 молекулы на их поверхности в иммунном ответе против *F. tularensis*.

Другой эффекторной функцией Т-клеток является цитоллиз инфицированных клеток по перфорин-зависимому или Fas-зависимому механизмам [32, 249]. Оценка уровня экспрессии поверхностных антигенов, появление которых на мембране CD8⁺ Т-клеток связано со специфической дегрануляцией, позволяет изучать цитотоксические реакции Т-лимфоцитов. Для оценки цитотоксической активности CD8⁺ Т-клеток «золотым стандартом» считается определение уровня экспрессии CD107a молекулы на поверхности клеток [249]. Таким образом, комбинация методов оценки спектра продуцируемых цитокинов и цитотоксической активности CD8⁺ Т-клеток позволяет детально изучить и охарактеризовать антигенспецифический Т-клеточный ответ на *F. tularensis*.

Клеточный иммунный ответ включает три основные фазы – индуктивную, эффекторную и формирование иммунологической памяти. Основные события индуктивной фазы – презентация специфического антигена наивным Т-клеткам и их дифференцировка в эффекторные клетки. Эти процессы происходят в первую неделю иммунного ответа. В эффекторную фазу происходит реализация защитных иммунных реакций эффекторными клетками: синтез цитокинов и цитоллиз инфицированных клеток [32]. В результате первичной вакцинации или инфекции, после завершения эффекторной фазы Т-клеточного иммунного ответа и элиминации патогена, 90-95 % антиген-специфических $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитов подвергаются апоптозу и процесс завершается формированием популяции Т-клеток памяти. Т-клетки памяти возникают на 3-4 неделю иммунного ответа и в зависимости от возбудителя инфекции сохраняются длительное время или пожизненно [116].

$CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетки памяти отличаются от наивных и эффекторных клеток деталями мембранного фенотипа, обуславливающим дальнейшую их локализацию и пути рециркуляции [32], а также отсутствием функциональной активности при первичном иммунном ответе. В процессе дифференцировки Т-клеток в эффекторные и Т-клетки памяти они начинают экспрессировать молекулу CD44, не свойственную наивным Т-клеткам. Другой молекулой, характерной для Т-клеток памяти является CD45RO. При дифференцировке Т-клеток в эффекторные клетки происходит видоизменение структуры молекулы CD45: рецептор утрачивает домены А, В и С, что облегчает повторную активацию клетки. Также благодаря экспрессии различных интегринов и хемокиновых рецепторов эффекторные Т-клетки памяти (T_{EM}) способны мигрировать в барьерные и нелимфоидные ткани, обеспечивая быструю локальную защиту от повторного заражения [32]. В настоящее время фенотипическим признаком Т-клеток памяти у людей принято считать CD45RO, а у мышей – CD44 [116].

Как у мышей, так и у людей наивные Т-клетки экспрессируют на своей поверхности рецептор хоминга CD62L и хемокиновый рецептор CCR7, которые обеспечивают рециркуляцию наивных Т-клеток. Эффекторные Т-клетки и T_{EM}

перестают экспрессировать на своей поверхности CD62L и CCR7, что обуславливает неспособность этих субпопуляций мигрировать во вторичные лимфоидные органы [116]. Помимо T_{EM} существует другая субпопуляция Т-клеток памяти – T_{CM} , отличающиеся по функциональным и миграционным свойствам. T_{CM} сохраняют способность экспрессировать молекулы CD62L и CCR7, свойственный наивным Т-клеткам, благодаря этому в процессе рециркуляции постоянно возвращаются в Т-зоны вторичных лимфоидных органов. Также T_{CM} сохраняют способность продуцировать IL-2 и обладают высоким пролиферативным потенциалом. T_{CM} и T_{EM} являются разными стадиями дифференцировки Т-клеток памяти: T_{CM} являются предшественниками T_{EM} и при необходимости дифференцируются в эффекторные клетки памяти, тем самым поддерживая иммунный гомеостаз.

В современной литературе работы по изучению влияния иммунизации туляреминой вакциной на дифференцировку Т-клеток памяти на T_{CM} и T_{EM} немногочисленны и все проведены на вакцинном штамме *F. tularensis* LVS [49, 235]. В настоящее время основная часть проводимых исследований сосредоточена на изучении иммунологических реакций, отражающих защиту против вирулентных штаммов *F. tularensis* на 21-28 сутки после вакцинации – эффекторную фазу иммунного ответа [85, 157]. Роль $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток и их дифференцировки в T_{CM} и T_{EM} в долгосрочной защите от вирулентных практически не изучена.

В работе по изучению длительности иммунитета показано, что иммунизация штаммом LVS индуцировала формирование протективного иммунитета у мышей на 30 и 90 сутки после заражения высоковирулентным штаммом *F. tularensis* Shu, которая была обусловлена генерацией $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток памяти в селезенке и легких и синтезом ими IFN- γ [38]. Однако, в данном исследовании детально не были изучены механизмы формирования иммунологической памяти, а именно влияние вакцинации на дифференцировку Т-клеток памяти на субпопуляции T_{EM} и T_{CM} и их функциональную активность. В другом исследовании показано, что бустерная иммунизация штаммом LVS обеспечивает 100 % защиту от

интраназального заражения через 30 суток высоковирулентным штаммом *F. tularensis* Schu посредством индукции $CD4^+$ и $CD8^+$ T_{EM} в легких и синтезом цитокинов IL-17A и IFN- γ [49]. Однако, при инфицировании животных через 60 суток по аналогичной схеме иммунизации все животные погибали. Следовательно, данное исследование позволяет сделать вывод, что через месяц после последней иммунизации наличие $CD4^+$ и $CD8^+$ T_{EM} обеспечивает защитный иммунитет, однако через 2 месяца после последней иммунизации и окончания первичного иммунного ответа большая часть эффекторных клеток устраняется и защиты не наблюдается, что еще раз подчеркивает важность генерации субпопуляции T_{CM} после вакцинации, индукция которых может опосредовать устойчивый длительный иммунитет и актуальность таких исследований. 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 T_{CM} и T_{EM} , их цитокин-продуцирующей активности и пролиферативного потенциала при повторной встрече с антигенами *F. tularensis*.

Поэтому изучение маркеров активации и спектра продуцируемых цитокинов T_{EM} и T_{CM} позволит определить какой тип Т-клеток памяти индуцирует исследуемая вакцина, и даст представление о функциональной активности этих субпопуляций и их роли в обеспечении эффективной защиты от туляреминой инфекции. Также можно сделать заключение о том, что только одновременное изучение экспрессии маркеров активации, рецепторов хоминга, хемокиновых рецепторов и спектра продуцируемых цитокинов Т-клеток, дает понимание механизмов формирования Т-клеточной иммунологической памяти.

1.7 Заключение по обзору литературы

Для формирования протективного иммунитета против *F. tularensis* необходимо, чтобы вакцина индуцировала генерацию антиген-специфических В-клеток, $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток. В настоящий момент активацию всех этих

эффекторных лимфоцитов обеспечивают только живые вакцины, полученные на основе аттенуированных штаммов *F. tularensis*. Выяснение клеточных механизмов формирования протективного иммунитета против *F. tularensis* имеет решающее значение для успешной разработки более эффективной противотуляремийной вакцины.

Простым способом оценки гуморального звена иммунитета является измерение титров специфических антител. Диагностически значимым при туляремийной инфекции являются титры IgG антител к ЛПС *F. tularensis*. Однако, как и для любого внутриклеточного патогена, обнаружение титров антител является показателем предшествующей вакцинации или перенесенной инфекции, но не является параметром, отражающим протективность противотуляремийного иммунитета.

Ключевым звеном в формировании протективного иммунитета против внутриклеточных бактерий *F. tularensis* является клеточный иммунитет, основанный на специфических иммунных реакциях популяций Т-лимфоцитов, что в конечном счете приводит к формированию Т-клеточной иммунологической памяти. Как уже было сказано выше, для формирования защитного иммунитета против туляремийной инфекции необходима генерация антиген-специфических CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток. Также при изучении иммунного ответа клеточного типа особое внимание уделяется анализу влияния вакцинации на генерацию и функциональную активность CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток памяти. Следовательно, при поиске критериев оценки протективного иммунитета главным образом необходимо изучить активацию и эффекторные функции данных субпопуляций Т-лимфоцитов, а также изучить их дифференцировку в Т-клетки памяти и длительность их циркуляции после вакцинации [226].

Иммунологическими параметрами, отражающими функциональную активность лимфоцитов, является оценка их пролиферативной активности, уровня экспрессии маркеров активации (например, CD69 и CD25) и костимулирующих молекул (CD28 и CD80/CD86), Т-клеточной иммунологической памяти в пуле

CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов (на основании коэкспрессии CD44 и CD62L) и спектра продуцируемых цитокинов [276].

Выявленные критерии оценки протективного противотуляремийного иммунитета способствовали бы более эффективному отбору перспективных штаммов-кандидатов в вакцинные. Поэтому в связи с вышеупомянутой необходимостью проведение исследований, направленных на идентификацию иммунологических параметров, отражающих протективность поствакцинального противотуляремийного иммунитета является актуальным направлением. Определение критериев оценки протективности иммунитета при экспериментальной туляремии на модели животных возможно приведет к идентификации таких же иммунологических параметров у человека, которые далее будут служить критериями оценки иммунологической эффективности вакцинации у людей [275].

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

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Микробиологические методы исследования

Штаммы микроорганизмов¹

Видовые и родовые названия штаммов микроорганизмов, использованных в работе, принадлежность, источники их получения представлены в таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Штаммы микроорганизмов, использованные в работе

№	Штамм	Характеристика	Источник
1	<i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ	subsp. <i>holarctica</i> , вакцинный штамм	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk» ФБУН ГНЦ ПМБ
2	<i>F. tularensis</i> 15/23-1Δ <i>recA</i>	<i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ с инактивированной одной из двух копий гена <i>iglC</i> и deletированным геном <i>recA</i>	
3	<i>F. tularensis</i> 15/23-1/ <i>sodB</i> Δ <i>recA</i>	<i>F. tularensis</i> 15/23-1Δ <i>recA</i> с модифицированным геном <i>sodB</i>	
4	<i>F. tularensis</i> Schu	subsp. <i>tularensis</i> , природный штамм	
5	<i>F. tularensis</i> 503	subsp. <i>holarctica</i> , природный штамм	

Среды и условия культивирования

Штаммы *F. tularensis* культивировали на плотной питательной среде FT-агаре (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболensk) 16-18 ч при температуре 37 °С. Для иммунизации и заражения экспериментальных животных бактериальную биомассу суспендировали в забуференном физиологическом растворе (ЗФР).

Анализ обсемененности селезенок

Определение обсемененности селезенок иммунизированных и интактных животных осуществляли на 1, 4, 7 и 14 сутки после инфицирования природным штаммом *F. tularensis* Schu. Для этого по 3 мыши из каждой группы подвергали

¹ Все исследования со штаммами микроорганизмов, представленные в настоящей работе, выполнялись в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП 1.3.2322-08 от 2008 года [1] и СП.1.3.1285–03 от 2003 года [2].

эвтаназии ингаляцией CO₂, изолировали стерильно селезенки и гомогенизировали индивидуально. Из гомогенизированной взвеси селезенок готовили ряд десятикратных разведений в 1 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ), которые высевали на FT-агар и инкубировали при температуре 37 °С. Учет результатов проводили через 4 суток.

2.2 Биотехнологические методы исследования

Антигены *F. tularensis*

Для специфической стимуляции лимфоцитов *in vitro* использовали препарат кислото-нерастворимый комплекс (КНК) *F. tularensis*. КНК *F. tularensis* – белково-липополисахаридная фракция, полученная из осветленного лизата бактерий *F. tularensis* 15 НИИЭГ в результате его закисления до pH 4,5. В выделенном кислотонерастворимом антигенном комплексе белок, нуклеиновые кислоты и липополисахариды находятся в процентном соотношении 49:25:5 [30].

Для получения препарата ЛПС использовали штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Бактериальные клетки культивировали на плотной питательной среде FT-агара при температуре 37 °С в течении 48 часов. Для получения биомассы культуру смывали с плотной питательной среды и лизировали буфером, содержащим 2 % SDS и 4 % 2-меркаптоэтанола, прогревали в течение 10 мин при температуре 100 °С и обрабатывали протеиназой К. Проводили изучение полученных препаратов методом электрофореза в 12,5 % полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ПААГ-ДСН) по стандартной методике Лэммли.

2.3 Биологические методы исследования

Экспериментальные животные

Для проведения исследований были использованы мыши инбредной линии BALB/c(H2^d) (питомник «Пушино», ФИБХ РАН, Московская обл., г. Пушино). Масса мышей составляла 18-20 г, возраст – 6-8 недель. Все стадии исследования соответствовали законодательству Российской Федерации [13, 27] и

Директиве Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных [5, 28]. Мыши содержались по 5 штук в клетках типа «микроизолятор» общей площадью 484 см², на подстиле из древесных опилок не хвойных пород. Мыши получали автоклавированный стандартный корм ПК – 120 экструдированный и имели свободный доступ к стерильной воде.

Схема иммунизации и инфицирования животных

Для изучения иммуногенной активности исследуемых штаммов мыши были иммунизированы однократно вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производными штаммами *F. tularensis* 15/23-1 Δ recA и *F. tularensis* 15/23-1/sodB Δ recA. Мышей иммунизировали однократно подкожно в паховую область, используя иглы 23G, в дозе от 30 до 100 КОЕ/мл штаммами *F. tularensis* в зависимости от предварительно оцененной вирулентности (LD₅₀) каждого из штаммов: 15 НИИЭГ — 79 микробных клеток (м.к.)/мышь, 15/23-1 Δ recA — 2·10⁴ м.к./мышь, 15/23-1/sodB Δ recA — 3·10⁴ м.к./мышь. Наблюдение за экспериментальными животными проводили в течение времени необходимого для задач экспериментов.

Для изучения протективных свойств исследуемых вакцинных штаммов половину иммунизированных животных заражали природными штаммами: *F. tularensis* 503 subsp. *holarctica* подкожно в дозе 1000 DCL (3000 м.к./мышь); *F. tularensis* Schu subsp. *tularensis* подкожно или интраназально в дозе 1000 DCL (3000 м.к./мышь). Наблюдение за животными проводили в течение 21 суток, измеряя их вес. В качестве контроля выступала группа интактных мышей.

Для расчета фактически вводимых доз делали высевы (не менее двух повторов) культур всех штаммов *F. tularensis* из седьмого разведения по 0,1 мл на плотную питательную среду FT-агар.

Образцы сывороток

В контрольные точки эксперимента проводили эвтаназию животных, получали кровь, помещая в стерильные пробирки для исследования сыворотки Vacutest с активатором свертывания и гелем (Vacutest KIMA, Италия), отстаивали при комнатной температуре от плюс 18 °С до плюс 20 °С в течение 30-60 мин, затем

центрифугировали при 5000 g в течение 10 мин. После центрифугирования сыворотки отбирали в стерильные пробирки, разделяли на аликвоты и хранили при минус 80 °С до использования.

Получение популяции лимфоцитов селезенки

Для получения спленоцитов проводили эвтаназию мышей, затем стерильно вскрывали брюшную полость и изолировали селезенки. Далее мышинные селезенки гомогенизировали через нейлоновый клеточный фильтр с диаметром поры 100 микрон (Fisher Scientific, США) в среде RPMI 1640 (ПанЭко, Москва), содержащей 20 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС) производства Gibco, США. Полученную клеточную суспензию наслаивали на градиент плотности Histopaque-1,077 (Sigma, США) в соотношении 1:1 и центрифугировали в течении 15 мин при 1000 g для последующего выделения мононуклеарных клеток. Далее отбирали опалесцирующее кольцо, содержащее клеточную взвесь, дважды отмывали в ФБС с 2 % ФБС, центрифугируя в течении 10 мин при 200 g. Клеточный осадок ресуспендировали в полной питательной среде следующего состава: среда RPMI 1640 (ПанЭко, Москва), 10 % ФБС, 2 mM L-глутамин (Sigma, США), 10 mM HEPES (Flow, Англия), 40 мг/л гентамицин, 25 мкМ 2-меркаптоэтанол (Sigma, США). Жизнеспособность и концентрацию клеток определяли в тесте с трипановым синим на автоматическом клеточном счетчике TC20 (Bio-Rad, США). Количество жизнеспособных лимфоцитов доводили до концентрации 2×10^6 клеток/мл.

Стимуляция лимфоцитов

В качестве специфического стимулятора в экспериментах *in vitro* использовали КНК *F. tularensis*. Лимфоциты (1×10^6 клеток/мл) инкубировали в лунках 96-луночного планшета в объеме среды 200 мкл при температуре 37 °С, во влажной атмосфере, 5 % углекислого газа (CO₂) в присутствии 10 мкг/мл антигена КНК *F. tularensis*. В качестве положительного неспецифического контроля при анализе пролиферативной активности лимфоцитов использовали поликлональный активатор клеток Конканавалин А (Con A) производства Sigma, США. В качестве положительного контроля для оценки неспецифической стимуляции синтеза

цитокинов использовали образец клеток, стимулированный 10 нг/мл форбол-12-миристат-13-ацетата (Sigma, США) и 1 мкг/мл иономицина (Sigma, США). В качестве отрицательного контроля выступали клетки, инкубируемые в полной питательной среде RPMI в отсутствии антигенов.

На этапе исследования внутриклеточных цитокинов для ингибирования транспорта белков и накоплению цитокинов в комплексе Голджи использовали дополнительно GolgiPlug (BD Bioscience, США), содержащий брефельдин А.

Для выявления субпопуляций активированных лимфоцитов по поверхностным маркерам клетки инкубировали в течение 24 ч; для анализа внутриклеточных цитокинов – 24-48 ч; для анализа уровня цитокинов в надосадочной жидкости (супернатанты хранили не более месяца при температуре минус 80 °С) – 72 ч; для определения пролиферативной активности лимфоцитов с помощью метода CFSE – в течении пяти суток.

2.4 Иммунологические методы исследования

Определение титров специфических IgG антител в сыворотке крови

Оценку гуморального иммунитета проводили на основе выявления специфических к *F. tularensis* антител в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) согласно руководству [173]. В качестве адсорбированного антигена использовали препарат ЛПС *F. tularensis* высокой степени очистки [4]. Для этого в 96-луночные плоскодонные планшеты вносили 100 мкл раствора антигена в концентрации 10 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), инкубировали в течение 2 ч при 37 °С при перемешивании на орбитальном шейкере. Планшеты трижды промывали ФСБ с 0,05% Tween-20 (ФСБ-Т), вносили в каждую лунку по 200 мкл блокирующего буфера (5%-ное обезжиренное молоко в ФСБ), инкубировали 1 ч при комнатной температуре и трижды промывали ФСБ-Т. В лунки вносили по 100 мкл разведенных в ФСБ сывороток крови и инкубировали планшеты в течение 1 ч при 37 °С с перемешиванием. Для анализа использовали двукратные разведения сывороток – в диапазоне от 1:50 до 1:3200.

Планшеты трижды промывали ФСБ-Т, вносили в лунки по 100 мкл кроличьих антител против IgG мыши (Sigma), конъюгированных с пероксидазой хрена (HRP), в разведении 1:10 000 в ФСБ-Т, инкубировали в течение 1 ч при 37 °С с перемешиванием и отмывали ФСБ-Т. В лунки вносили по 100 мкл раствора субстрата — 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (TMB; Sigma). Ферментативную реакцию останавливали через 15 мин, добавляя в лунки по 50 мкл 1 М серной кислоты. Оптическую плотность регистрировали при длине волны 450 нм на приборе Thermo Scientific Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific). В качестве отрицательного контроля использовали сыворотку интактных мышей. Положительным считали результат реакции в лунках, оптическая плотность в которых превышает показатели оптической плотности отрицательных контролей не менее чем в 2 раза.

Определение системы цитокинов

Для оценки синтеза цитокинов использовали несколько методов: количественное определение субпопуляций лимфоцитов, синтезирующие те или иные цитокины методом внутриклеточного окрашивания цитокинов; определение концентраций цитокинов в сыворотке крови и клеточном супернатанте лимфоцитов с помощью мультиплексного анализа на системе «Bio-plex» (BioRad, США).

Для выявления процентного содержания субпопуляций лимфоцитов, синтезирующих цитокины, после 24-часовой стимуляции лимфоцитов тулярийным антигеном в стерильных условиях к суспензии клеток добавляли по 1 мкл ингибитора транспорта белков BD GolgiPlug согласно инструкции производителя набора Cytofix/CytopermTM Plus Fixation/Permeabilization Kit (BD, США) и инкубировали в течение 6 ч в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °С. Через 6 ч клеточную суспензию фиксировали и пермеабелизировали добавлением 250 мкл коммерческого раствора Cytofix/Cytoperm. Далее отмывали в фосфатно-солевом буфере, содержащем 0,5 % раствор сапонины (BD Biosciences, США). После этих процедур проводили окрашивание поверхностных антигенов лимфоцитов

коммерческими моноклональными антителами и внутриклеточное окрашивание моноклональными антителами против исследуемых цитокинов.

Цитокиновый профиль сыворотки крови определяли с помощью мультиплексного анализа на системе «Bio-plex» (BioRad, США). Данный метод представляет собой мультиплексную иммунную реакцию, протекающую на магнитных частицах, с последующим анализом спектра флуоресценции и одновременным определением содержания цитокинов. В данной работе был использован коммерческий набор Miliplex map со стандартной панелью на 32 цитокина (Merk, Германия). Дальнейшие манипуляции выполняли в соответствии с протоколом производителя.

2.5 Методы проточной цитометрии

Окрашивание поверхностных маркеров

Субпопуляционный состав лимфоцитов определяли на основании анализа фенотипа – набора CD-маркеров, экспрессируемых на поверхности клетки и участвующих в выполнении функций, специфичных для каждого подмножества лимфоцитов. В эксперименте для этого использовали коммерческие моноклональные антитела производства Becton Dickinson (США). Для фенотипирования клеток мы использовали следующие комбинации моноклональных антител и флуорохромов: активированные цитотоксические Т-лимфоциты и Т-хелперы – CD3 FITC, CD4 BV700 или CD4 APC, CD8 APC-су7 или CD8 PE, CD69 BV421, CD25 PerCP-су5.5, CD28 PerCP-су5.5; Т-клетки памяти – CD3 APC, CD8 APC су7, CD4 BV700, CD62L FITC, CD44 PE и CD69 BV421. Т-хелперы центральной ($CD4^+$ Т_{СМ}) и эффекторной ($CD4^+$ Т_{ЕМ}) памяти идентифицировали как субпопуляции $CD3^+CD4^+CD44^+CD62L^+$ и $CD3^+CD4^+CD44^+CD62L^-$, соответственно; клетки с фенотипами $CD3^+CD8^+CD44^+CD62L^+$ и $CD3^+CD8^+CD44^+CD62L^-$ – как цитотоксические Т-клетки центральной ($CD8^+$ Т_{СМ}) и эффекторной ($CD8^+$ Т_{ЕМ}) памяти. Для сравнительной анализа функциональной активности вышеуказанных

субпопуляций Т-клеток памяти оценивали уровень экспрессии CD69 молекулы на их поверхности.

Для анализа процентного содержания активированных В-лимфоцитов использовали моноклональные антитела против CD19 APC, CD69 FITC, CD86 PE и CD25 PerCP-су5.5. Лимфоциты окрашивали в темноте при комнатной температуре в течение 20 мин в соответствии с инструкцией производителя. Затем отмывали в ФСБ с 2 % ФБС и фиксировали 1 % раствором формалина. Образцы анализировали на проточном цитофлуориметре FACSAria III (Becton Dickinson), оснащенный тремя лазерами с длинами волн излучения 405, 488 и 633 нм. В каждом образце проводили анализ не менее 10 000 клеток по гейту лимфоцитов. Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения BD FACSDiva software v8.0.1 (BD Biosciences, США).

Для иммунофенотипирования отдельных субпопуляций клеток использовали метод многоэтапного гейтирования – инструмент выделения из всего массива полученных данных отдельных популяций клеток и последующего их анализа. Схема гейтирования представлена на рисунке 2.1 на примере выделения субпопуляций активированных Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов.

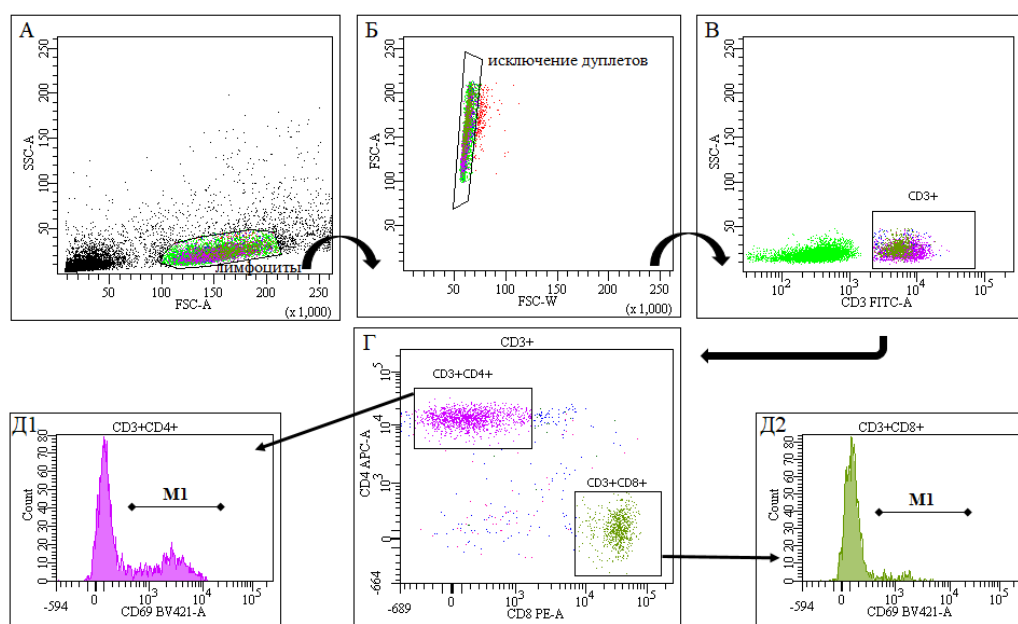


Рисунок 2.1 – Применение «тактики» гейтирования субпопуляций Т-лимфоцитов (пояснения далее в тексте). Область M1 – активированные клетки.

Сначала проводили гейтирование по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию, что позволяло определить размер и гранулярность, соответственно (рисунок 2.1 А). Далее проводили гейтирование по каналу FSC-A/FCS-W для исключения дуплетов из анализа (рисунок 2.1 Б). Для выделения субпопуляций Т- и В-лимфоцитов строили диаграммы по каналам SSC-A/CD 3 FITC (рисунок 2.1 В) и SSC-A/CD19 APC, соответственно. Для разделения CD3⁺ лимфоцитов использовали построение диаграммы по каналам CD4 APC против CD8 PE (рисунок 2.1 Г). Такая тактика гейтирования позволяла отдельно анализировать основные субпопуляции лимфоцитов. Гейтированные субпопуляции далее анализировали на наличие экспрессии маркеров активации (CD69 BV421 и CD25 PerCP-су5.5), костимулирующих молекул (CD28 PE и CD86 PE) и уровня активности синтеза цитокинов (IFN- γ PE, TNF- α APC и IL-4). Пример дальнейшего анализа гейтированных лимфоцитов показан на гистограммах Д1 и Д2 на примере тактики гейтирования активированных Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов, основанной на анализе экспрессии маркера ранней активации CD69 (рисунок 2.1, гистограммы Д1-Д2, область М1).

Также был проведен сравнительный анализ CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток памяти на основании уровня экспрессии молекул CD62L и CD44. Гейтирование и уровни дифференцировки клеток представлены на рисунке 2.2 на примере субпопуляции Т-хелперов (CD4⁺ клеток).

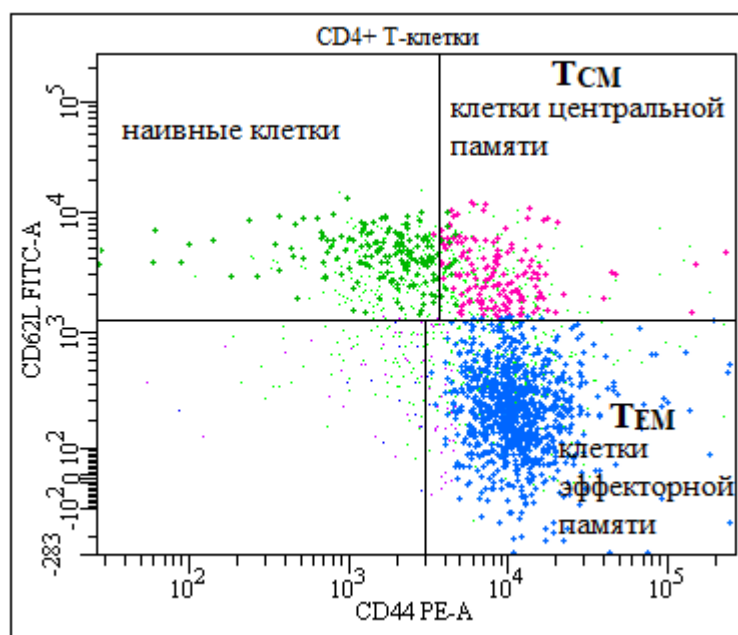


Рисунок 2.2 – Выявление основных стадий дифференцировки Т-хелперов на основании наличия экспрессии CD62L и CD44. Приведены наивные клетки с фенотипом $CD3^+CD4^+CD62L^+CD44^-$, ТсМ и Тем клетки памяти с фенотипами $CD3^+CD4^+CD62L^+CD44^+$ и $CD3^+CD4^+CD62L^-CD44^+$, соответственно.

Окрашивание внутриклеточных цитокинов

После предварительной стимуляции, пермеабилизации и фиксации лимфоциты окрашивали моноклональными антителами против поверхностных маркеров и исследуемых цитокинов: CD3 FITC, CD8 APC-су7, CD4 BV700, CD62L FITC, CD44 PE, CD19 APC, IFN- γ PE или IFN- γ PerCP-су5.5, TNF- α APC и IL-4 (Becton Dickinson, США). После добавления моноклональных антител исследуемые образцы инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 20 мин. Затем отмывали в ФСБ с 2 % ФБС, центрифугируя при 200 g в течение 10 мин и фиксировали в 1 % растворе формалина. Анализировали на проточном цитофлуориметре не позднее 24 ч.

Окрашивание лимфоцитов карбоксифлуоресцеином

Для оценки пролиферативной активности субпопуляций лимфоцитов клетки предварительно окрашивали 6-карбоксифлуоресцеином диацетатом (CFSE) в соответствии с инструкцией производителя (Invitrogen, США). Перед окрашиванием клетки в концентрации 5×10^7 кл/мл отмывали дважды,

центрифугируя при 200 g 10 мин в ФСБ с 2 % ФБС. Далее лимфоциты ресуспендировали в ФСБ комнатной температуры и добавляли 0,2 мкл 5 mM раствор красителя CFSE, перемешивали и инкубировали в течение 10 мин при температуре 37 °C в атмосфере 5 % углекислого газа (CO₂) и 5 % влажности. Затем добавляли 5 мл охлажденной среды RPMI-1640 и инкубировали на холоде в течение 5 мин. По окончании инкубации клетки трижды отмывали ФСБ с 2 % ФБС, центрифугируя при 200 g 10 мин при комнатной температуре. Далее лимфоциты доводили до концентрации 1×10^6 кл/мл, вносили в лунки 96-луночного планшета в соответствии со схемой эксперимента и инкубировали в течение пяти дней при температуре 37 °C в атмосфере 5 % CO₂ и 5 % влажности. На третьи сутки при необходимости обновляли среду. На пятые сутки клеточную суспензию переносили в цитометрические пробирки и дополнительно окрашивали моноклональными антителами против поверхностных маркеров основных субпопуляций лимфоцитов: Т-лимфоцитов – CD3 APC, CD4 BV700 и CD8 APC-су7; В-лимфоцитов – CD19 APC. После окрашивания моноклональными антителами клетки дважды отмывали избытком ФСБ с 2 % ФБС, фиксировали 2 % формалином и проводили цитометрический анализ в течение 24 ч. Подсчет пролиферирующих клеток проводили на проточном цитофлюориметре на основании снижения уровня флуоресценции CFSE. В каждом образце анализировали не менее 10 000 событий по гейту лимфоцитов. Компенсацию настраивали автоматически в программе BD FACSDiva с использованием единично окрашенных образцов клеток следующими флуорохромами: CFSE, APC, BV700 и APC-су7. Для настройки прибора были использованы следующие контрольные образцы: неокрашенный образец, окрашенный нестимулированный митогенами образец (отрицательный контроль), окрашенный и стимулированный митогеном Con A образец (положительный контроль). Неокрашенный образец необходим для настройки фоновой флуоресценции, в этом случае пик флуоресценции гистограммах располагается не дальше второй декады логарифмической шкалы флуоресценции CFSE (рисунок 2.3 А). Нестимулированный окрашенный CFSE образец клеток был необходим для оценки

спонтанной пролиферации и выделения области на гистограмме, где будут находиться непролиферирующие клетки (рисунок 2.3 Б). В качестве положительного контроля использовали окрашенный образец клеток, инкубация которых проходила в присутствии неспецифического митогена Con A (рисунок 2.3 В).

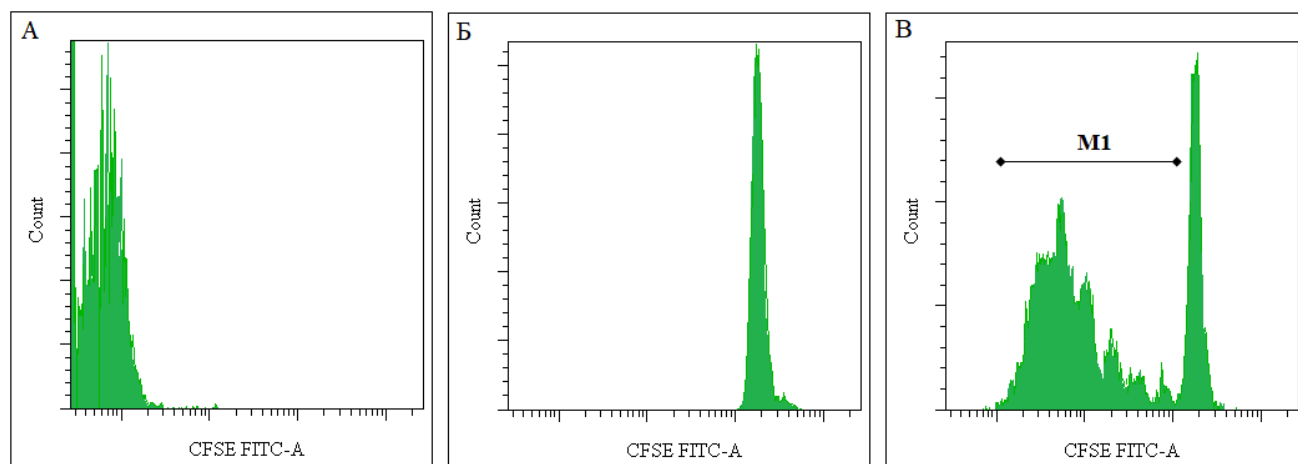


Рисунок 2.3 – Анализ гистограмм при оценке пролиферативной активности лимфоцитов, окрашенных CFSE.

Примечание 1: По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции CFSE, по оси ординат – количество клеток. Гистограмма А – пример неокрашенных и нестимулированных лимфоцитов. Гистограмма Б – пример окрашенных и непролиферирующих лимфоцитов. Гистограмма В – пример окрашенных и пролиферирующих лимфоцитов (область M1), стимулированных Con A.

2.6 Статистические методы исследований

Систематизация исходной информации, визуализация полученных результатов и статистическая обработка осуществлялись при помощи программного обеспечения GraphPad Prism 6.00 для Windows (GraphPad Prism Software, США). Различия считали статистически значимыми, если значение p не превышало 0,05. LD₅₀ штаммов определяли по методике Кербера в модификации Ашмарина. Оценка протективной активности проводилась по методу Каплана-Мейера. Данные по титрам антител в сыворотке крови, цитокинам в клеточном супернатанте и обсемененности селезенки выражали как среднее среднеарифметическое значение группы $\pm$ стандартное отклонение (SD). Результаты цитометрических данных описывались в виде процента клеток от искомой субпопуляции и описывались при помощи значений медианы (Me) и

интерквартильного размаха (Q25:Q75). Статистический анализ при сравнении данных двух групп проводили с использованием непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Сравнение данных трех и более групп проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и последующим тестом множественных сравнений с помощью критерия Тьюки. Взаимосвязь между переменными определяли с помощью корреляционного анализа (коэффициент ранговой корреляции Спирмена). При выявлении статистически значимых корреляций анализ был дополнен линейной регрессией. Значения коэффициента корреляции (r) интерпретировали в соответствии со шкалой Чеддока: слабая – от 0,1 до 0,3; умеренная – от 0,3 до 0,5; заметная – от 0,5 до 0,7; высокая – от 0,7 до 0,9; сильная – от 0,9 до 1,0.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ИММУННОГО ОТВЕТА У МЫШЕЙ В РАННИЕ СРОКИ ПОСЛЕ ВАКЦИНАЦИИ ШТАММАМИ *F. TULARENSIS*

Специфический иммунный ответ представляет собой реакцию преимущественно популяции лимфоцитов, однако его запуск и осуществление невозможны без участия системы врожденного иммунитета. Клетки врожденной иммунной системы и наивные лимфоциты способны быстро реагировать на проникновение *F. tularensis* без антиген-специфической адаптации в течение первых 5 дней после инфицирования [163]. В исследовании на людях было показано, что введение штамма *F. tularensis* LVS вызывает активацию $\gamma\delta$ Т-клеток и NK-клеток уже через 24 ч после вакцинации, а также индукцию экспрессии провоспалительных генов, что приводит к активации врожденного иммунитета [124]. В другой работе было выявлено, что ранняя защита мышей на третий день после инфицирования сублетальной дозой штамма *F. tularensis* LVS, зависела от В-клеток и протективный эффект был обусловлен ограничением репликации бактерий посредством их цитокин-продуцирующей активности [97].

Данная глава диссертации посвящена комплексному исследованию по изучению иммунного ответа у мышей линии BALB/c в ранние сроки после вакцинации штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производными штаммами 15/23-1/*sodB* Δ *recA* и 15/23-1 Δ *recA*. Схема экспериментов к Главе 3 представлена на рисунке 3.1.



Рисунок 3.1 – Схема экспериментов к Главе 3.

3.1 Сравнительный анализ изменения субпопуляционного состава В-клеток крови и селезенки в ранние сроки иммуногенеза у мышей после вакцинации штаммами *F. tularensis*

На этом этапе исследования задача заключалась в сравнительном анализе субпопуляции В-клеток в селезенке и крови мышей, иммунизированных вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производными: штаммами *F. tularensis* 15/23-1/*sodBΔrecA* или *F. tularensis* 15/23-1 Δ *recA* на 3 сут иммуногенеза. Исследование проводили с помощью метода проточной цитометрии. В таблице 3.1 представлено изменение экспрессии маркеров активации и ко-стимулирующей молекулы CD86 в субпопуляции В-клеток.

Таблица 3.1 – Изменение субпопуляционного состава В-клеток, полученных из крови и селезенки мышей линии BALB/c, после иммунизации штаммами *F. tularensis*.

	Группы мышей*				
Субпопуляции лимфоцитов	<i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ	<i>F. tularensis</i> 15/23-1/ <i>sodBΔrecA</i>	<i>F. tularensis</i> 15/23-1 <i>ΔrecA</i>	Контроль	p**
Показатели крови, %					
CD19 ⁺ CD69 ⁺	7,56±0,60	7,74±0,53	4,56±0,39	3,06±0,9	p ₂ <0,05 p ₃ <0,05
CD19 ⁺ CD25 ⁺	8,4±0,86	5,02±0,23	5±0,15	4,96±0,09	p ₁ <0,05 p ₃ <0,05
CD19 ⁺ 30 ⁺	3,68±0,30	7,36±0,59	3,62±0,59	3,11±0,07	p ₁ <0,05 p ₂ <0,05
CD19 ⁺ CD86 ⁺	8,2±0,70	7,69±0,65	4,34±0,41	3,94±0,1	p ₂ <0,05 p ₃ <0,05
Показатели спленоцитов, %					
CD19 ⁺ CD69 ⁺	5,95±0,57	6,25±0,45	2,94±0,24	2,98±0,64	p ₂ <0,05 p ₃ <0,05
CD19 ⁺ CD25 ⁺	3,14±0,1	3,54±0,11	3,28±0,15	3,21±0,44	
CD19 ⁺ 30 ⁺	5,05±0,86	5,55±1,18	3,66±0,39	3,24±0,66	
CD19 ⁺ CD86 ⁺	13,74±1,01	12,41±0,97	6,77±1,27	5,06±0,07	

Примечания –*– Показанные результаты являются данными трех независимых экспериментов, каждый с использованием 5-ти отдельных животных в группе.

–**– достоверность отличий по U-критерию Манна-Уитни между группами мышей, иммунизированных: p₁<0,05 – *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *F. tularensis* 15/23-1/*sodBΔrecA*; p₂<0,05 – *F. tularensis* 15/23-1/*sodBΔrecA* и *F. tularensis* 15/23-1 Δ *recA*; p₃<0,05 – *F. tularensis* 15/23-1 Δ *recA* и *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

Анализ субпопуляции В-клеток показал достоверное увеличение $CD19^+CD69^+$ клеток в селезенке и крови мышей, вакцинированных штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *F. tularensis* 15/23-1/*sodBΔrecA*. Было отмечено достоверное увеличение количества $CD19^+CD25^+$ клеток в крови мышей, вакцинированных штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ. В группе мышей, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15/23-1/*sodBΔrecA*, в крови наблюдали увеличение $CD19^+30^+$ субпопуляции. Уровень экспрессии ко-стимулирующей молекулы CD86 достоверно увеличивался на поверхности В-клеток, выделенных из селезенки и крови, вакцинированных штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *F. tularensis* 15/23-1/*sodBΔrecA*. На 3 сут после иммунизации мышей штаммом *F. tularensis* 15/23-1/*ΔrecA* в популяции В-лимфоцитов изменения уровня экспрессии анализируемых молекул выявлено не было.

3.2 Сравнительный анализ изменения субпопуляционного состава Т-клеток крови и селезенки в ранние сроки иммуногенеза у мышей после вакцинации штаммами *F. tularensis*

Задачи данного этапа исследования – сравнить изменение процентного содержания активированных Т-клеток в селезенке и крови мышей, иммунизированных вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производными: *F. tularensis* 15/23-1/*sodBΔrecA* или *F. tularensis* 15/23-1/*ΔrecA* на 3 сут иммуногенеза.

Сравнительный анализ субпопуляций Т-клеток показал, что на 3 сут после иммунизации штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ у мышей происходила активация Т-хелперов ($CD3^+CD4^+$), о чем свидетельствовало повышение уровней экспрессий молекул CD69 и CD30 (таблица 3.2). В группе мышей, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15/23-1/*sodBΔrecA* наблюдалась активация как Т-хелперов, так и цитотоксических Т-лимфоцитов. А у мышей, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15/23-1/*ΔrecA* на 3 сут иммуногенеза не наблюдалось достоверного увеличения процента $CD69^+$ или $CD30^+$ Т-клеток.

Таблица 3.2 – Изменение субпопуляционного состава Т-клеток, полученных из крови и селезенок мышей линии BALB/с, после иммунизации штаммами *F. tularensis*

	Группы мышей*				
Субпопуляции лимфоцитов	<i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ	<i>F. tularensis</i> 15/23-1/ <i>sodBΔrecA</i>	<i>F. tularensis</i> 15/23-1 Δ <i>recA</i>	Контроль	p**
Показатели крови, %					
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD69 ⁺	3,39±0,18	3,87±0,14	4,19±0,16	4,23±0,06	
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺	3,88±0,12	3,72±0,18	3,6±0,17	3,16±0,06	
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD30 ⁺	6,32±0,44	5,27±0,49	2,9±0,13	2,98±0,64	p ₂ <0,05 p ₃ <0,05
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD28 ⁺	4,19±0,28	3,73±0,22	3,34±0,89	3,31±0,08	
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD69 ⁺	3,2±0,14	7,24±0,62	5,54±0,67	3,34±0,76	p ₁ <0,05
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁺	3,87±0,26	7,12±0,48	6,73±0,51	3,18±0,07	p ₁ <0,05 p ₃ <0,05
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD30 ⁺	7,08±0,29	3,57±0,15	3,22±0,1	3,12±0,59	p ₁ <0,05 p ₃ <0,05
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD28 ⁺	3,38±0,51	2,96±0,10	3,98±0,19	3,19±0,08	
Показатели спленоцитов, %					
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD69 ⁺	9,2±0,82	10,5±0,71	6,0±0,18	5,85±0,07	p ₂ <0,05 p ₃ <0,05
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺	5,04±0,16	4,5±0,24	4,09±0,18	4,4±0,06	p ₂ <0,05 p ₃ <0,05
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD30 ⁺	4,2±0,7	5,0±0,36	3,8±0,42	3,5±0,02	
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD28 ⁺	8,4±0,89	4,34±0,47	3,37±0,17	3,18±0,05	p ₁ <0,05 p ₃ <0,05
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD69 ⁺	7,57±0,86	12,7±1,18	5,54±0,53	5,42±0,13	p ₁ <0,05 p ₂ <0,05
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁺	3,73±0,2	4,41±0,26	3,29±0,19	3,32±0,07	
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD30 ⁺	3,85±0,2	4,52±0,41	4,48±0,26	3,3±0,08	
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD28 ⁺	3,93±0,21	9,62±0,01	4,16±0,34	3,94±0,76	p ₁ <0,05 p ₂ <0,05

Примечания –*– Показанные результаты являются данными трех независимых экспериментов, каждый с использованием 5-ти отдельных животных в группе.

–**– достоверность отличий по U-критерию Манна-Уитни между группами мышей, иммунизированных: p₁<0,05 – *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *F. tularensis* 15/23-1/*sodBΔrecA*; p₂<0,05 – *F. tularensis* 15/23-1/*sodBΔrecA* и *F. tularensis* 15/23-1 Δ *recA*; p₃<0,05 – *F. tularensis* 15/23-1 Δ *recA* и *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

В группе мышей, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15/23-1 Δ *recA*, было выявлено только увеличение CD3⁺CD8⁺CD25⁺ субпопуляции в крови.

Уровень экспрессии корецепторной CD28 молекулы увеличивался на Т-хелперах в группе мышей, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, и на поверхности цитотоксических Т-лимфоцитов после иммунизации штаммом *F. tularensis* 15/23-1/*sodBΔrecA*.

3.3 Определение концентраций цитокинов в сыворотке крови мышей после вакцинации штаммами *F. tularensis* в ранние сроки иммуногенеза

Цитокины представляют собой регуляторные пептиды, оказывающие плеiotропные биологические эффекты на различные типы клеток иммунной системы. Синтезируясь в очаге воспаления, цитокины воздействуют на клетки врожденной иммунной системы, включая фагоциты, натуральные киллеры, гранулоциты, а затем на Т- и В-клетки, осуществляя взаимосвязь между неспецифическими реакциями и формированием специфического иммунитета [29]. В ходе дальнейших исследований мы изучали цитокиновый профиль у мышей, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производными штаммами *F. tularensis* 15/23-1 Δ *recA* и *F. tularensis* 15/23-1/*sodBΔrecA* в ранние сроки иммуногенеза. Концентрацию цитокинов определяли в сыворотке крови мышей с помощью мультиплексного анализа на системе «Bio-plex» с использованием коммерческого набора Miliplex map со стандартной панелью на 32 цитокина.

Сравнительный анализ полученных данных показал, что уровни 11 (Eotaxin, IL-1 β , IL-4, IL-3, IL-7, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), LIF, RANTES и VEGF) из 32 исследуемых цитокинов не изменялись после вакцинации аттенуированными *F. tularensis* штаммами на 3 и 5 сут иммуногенеза в сравнении с контрольной группой мышей (*данные не приведены*). Наиболее выраженные изменения уровней цитокинов в сыворотке крови вакцинированных животных приведены на рисунке 3.2.

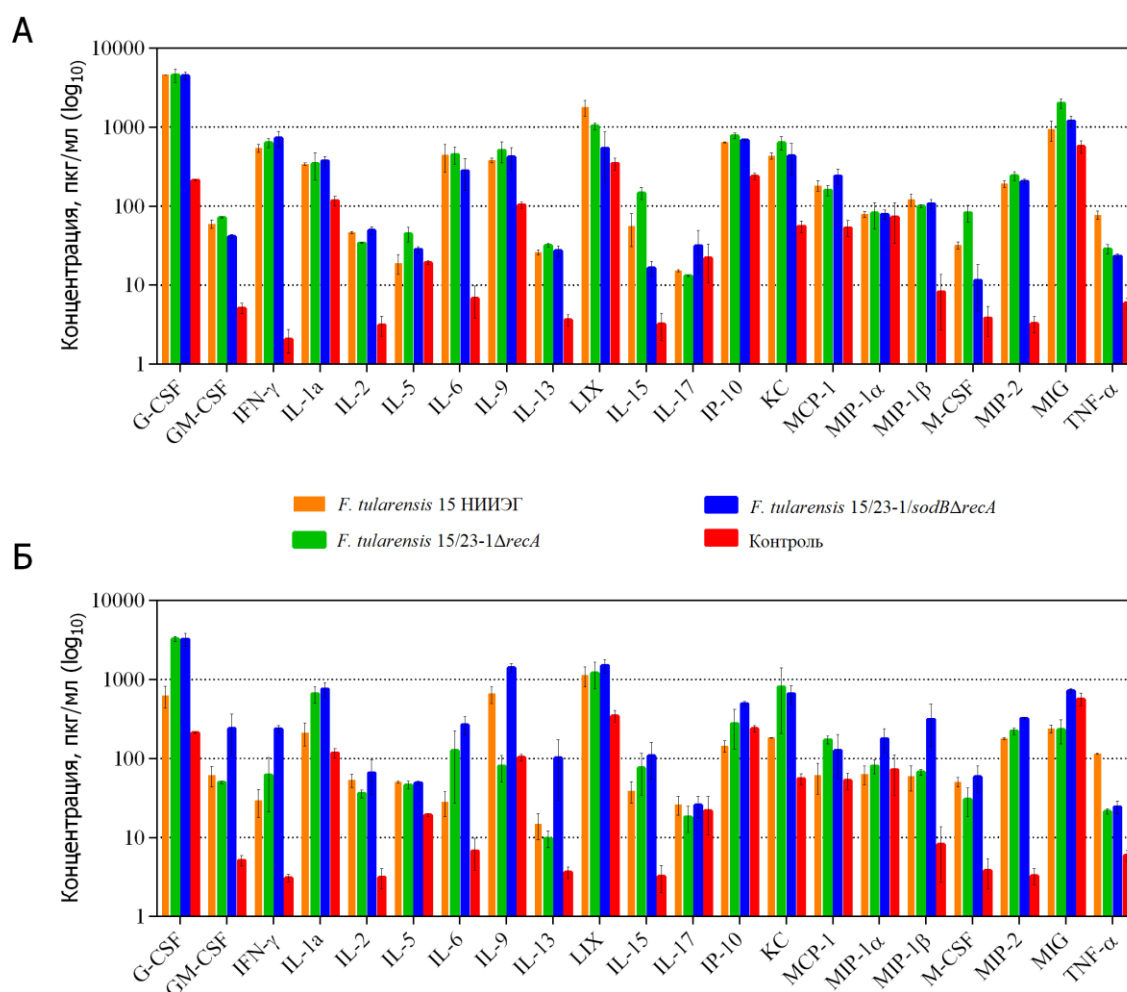


Рисунок 3.2 – Концентрация цитокинов в сыворотке крови мышей на 3 (А) и 5 (Б) сут после иммунизации штаммами *F. tularensis*.

Сравнительный анализ полученных результатов показал, что иммунизация всеми исследуемыми штаммами *F. tularensis* приводила к значимому (в 10 и более раз) увеличению в сыворотке крови мышей на 3 сут после вакцинации цитокинов G-CSF (в 19-22 раза), GM-CSF (в 8-12 раз), IFN- γ (в 260-351 раз), IL-2 (в 11-16 раз), IL-6 (в 41-66 раз), MIP-1 β (в 12-15 раз), MIP-2 (в 55-74 раза) в сравнении с интактной группой животных (рисунок 3.2 А). Значимое повышение уровня цитокина IL-15 наблюдалось в двух группах мышей, иммунизированных штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ (в 17 раз) и *F. tularensis* 15/23-1 Δ recA (в 46 раз); фактора роста M-CSF (в 22 раза) в группе вакцинированных штаммом

F. tularensis 15/23-1 Δ recA; TNF- α (в 13 раз) в группе вакцинированных штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

К 5 сут (рисунок 3.2 Б) после вакцинации во всех группах иммунных животных уровни цитокинов GM-CSF (в 10-47 раз), IL-2 (в 12-21 раз), IL-15 (в 12-34 раза), MIP-2 (в 59-99 раз) повышались по сравнению с контролем и этой же иммунизированной группой животных на 3 сутки иммуногенеза. В этот же срок в группе мышей, иммунизированных *F. tularensis* 15/23-1/*sodB* Δ recA, уровни G-CSF (в 15 раз), IL-9 (в 17 раз), IL-13 (в 28 раз) и MIP-1 β (в 38 раз) были выше по сравнению с контрольными мышами; в группе *F. tularensis* 15 НИИЭГ – уровни M-CSF (в 13 раз) и TNF- α (в 19 раз). Иммунизация рекомбинантными штаммами *F. tularensis* 15/23-1 Δ recA и *F. tularensis* 15/23-1/*sodB* Δ recA приводила также к повышению уровней цитокина IL-6 (в 19-39 раз) и хемокина KC (в 12-15 раз).

3.4 Заключение по Главе 3

На этом этапе исследования мы изучали механизмы формирования иммунного ответа, анализируя функциональную активность лимфоцитов и цитокиновый профиль в экспериментах *in vivo* в ранние сроки после вакцинации аттенуированными штаммами *F. tularensis*. Известно, что в первые дни после первичного проникновения бактерий формируются реакции врожденного иммунитета, а затем запускаются реакции адаптивного иммунитета [108, 226]. В связи с этим мы оценили уровень активации Т- и В-лимфоцитов в крови и селезенке мышей на 3 сут после их иммунизации разными штаммами бактерий *F. tularensis*.

Ранним маркером активации клеток является CD69 рецептор, который играет важную регулируемую роль в переключении неспецифических реакций иммунокомпетентных клеток на адаптивные, участвует в регуляции эффекторной активности лимфоцитов, а также CD69 отражает презентующую активность АПК [271]. Результаты наших экспериментов *in vivo* показали, что на 3 сут после вакцинации штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *F. tularensis* 15/23-1/*sodB* Δ recA у мышей в крови и селезенке увеличивалось количество CD69⁺ В-клеток, что

позволяет предположить об их активном включении в формирование специфических иммунных реакций. В этих же группах мышей увеличивалось количество В-клеток, экспрессирующих CD86 рецептор, что отражает усиление межклеточных взаимодействий. Об усилении межклеточных взаимодействий свидетельствует также повышение уровня CD28 молекулы при иммунизации *F. tularensis* 15 НИИЭГ на поверхности Т-клеток с фенотипом CD3⁺CD4⁺, а в группе мышей *F. tularensis* 15/23-1/*sodBΔrecA* – на поверхности CD3⁺CD8⁺ клеток. CD28 рецептор, который связывается с CD80 и/или CD86 рецепторами на АПК, является классической костимулирующей молекулой, участвующей в обеспечении нормального иммунного ответа. Для полной активации наивных Т-клеток и инициации ответов CD4⁺ клеток памяти необходимо не только распознавание антигена через TCR-рецептор, но и дополнительная костимуляция через рецептор CD28 через связывание с его лигандами CD86 или CD80, экспрессируемыми на поверхности АПК. Связывание CD28 с его лигандами, CD80/CD86, запускает транскрипционную программу, которая обеспечивает эффективную пролиферацию и дифференцировку Т-клеток. Отсутствие межрецепторных взаимодействий с CD28 рецептором приводит к формированию лимфоцитарной толерантности [192]. Также CD28 рецептор играет важную роль в клеточном иммунном ответе воспалительного типа. В частности, при взаимодействии антиген-специфических CD4⁺ Т-клеток Th1 типа с макрофагами через молекулы TCR/CD4 и CD28 происходит их взаимная активация и синтез цитокинов, а также активация цитолиза в фагосомах макрофагов [32].

В группе мышей, иммунизированных *F. tularensis* 15 НИИЭГ, отмечали усиление экспрессии CD25 рецептора на поверхности В-клеток. Как известно, лигандом CD25 рецептора является IL-2 при связывании которого происходит усиление пролиферативной активности лимфоцитов. По всей видимости, бактерии *F. tularensis* 15 НИИЭГ инициируют пролиферативную активность лимфоцитов раньше остальных штаммов сравнения. В группе мышей, иммунизированных *F. tularensis* 15/23-1/*sodBΔrecA* наблюдали повышение экспрессии CD30 рецептора на поверхности В-лимфоцитов, что, вероятно, отражает усиление эффекторной

активности клеток, так как появление CD30 молекулы коррелирует с активным синтезом этой клеткой IL-17A [133].

CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки также являются ключевыми медиаторами протективного туляремиального иммунитета [228, 237]. Об этом свидетельствует снижение протективного иммунитета у мышей BALB/c и C57BL/6 при истощении CD4⁺ или CD8⁺ Т-клеток у иммунных животных до заражения вирулентным штаммом *F. tularensis* [51]. Результаты наших исследований показали, что после вакцинации штаммом *F. tularensis* 15/23-1/*sodBΔrecA* увеличивалось количество CD69⁺-позитивных клеток в субпопуляциях Т-хелперов и цитотоксических лимфоцитов, а также CD3⁺CD8⁺CD25⁺ клеток. После вакцинации штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ в селезенке мышей достоверно увеличивалось количество только CD3⁺CD4⁺CD69⁺ клеток и CD3⁺CD8⁺CD30⁺ клеток. В группе мышей, вакцинированных штаммом *F. tularensis* 15/23-1 Δ *recA*, увеличивалось только содержание CD3⁺CD8⁺CD25⁺ клеток в крови.

Иммунизация аттенуированными штаммами приводила к увеличению в 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). Повышение уровней цитокинов Т-хелперных клонов первого (IFN- γ , IL-2, IL-15 и TNF- α) и второго (IL-5, IL-9 и IL-13) типов у иммунных мышей говорит о запуске активации клеточного и гуморального иммунитета и указывает на иммунный ответ смешанной Th1/Th2-направленности [29]. Об активации специфического иммунитета также свидетельствует увеличение концентраций провоспалительных цитокинов IL-1 α и IL-6 у всех иммунных животных по сравнению с интактной группой. 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/*sodBΔrecA* (в 4 раза), что указывает на снижение реактогенности новых аттенуированных штаммов [92].

Таким образом, было проведено комплексное исследование по изучению иммунного ответа у мышей линии BALB/c в ранние сроки после вакцинации

штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производными. На основании полученных данных об экспрессии маркеров активации (CD69, CD25 и CD30) и костимулирующих молекул (CD28 и CD86) на поверхности лимфоцитов охарактеризованы механизмы формирования иммунных реакций в ответ на вакцинацию аттенуированными штаммами *F. tularensis*, в частности, пролиферативной активности, эффекторных функций и межклеточных взаимодействий между субпопуляциями Т- и В-клеток, а также цитокиновый профиль сывороток крови иммунных и интактных животных.

ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТОРНОЙ ФАЗЫ ИММУННОГО ОТВЕТА У МЫШЕЙ ПОСЛЕ ВАКЦИНАЦИИ АТТЕНУИРОВАННЫМИ ШТАММАМИ *F. TULARENSIS*

На данном этапе исследования был проведен сравнительный анализ иммунологических параметров в эффекторную фазу иммунного ответа после вакцинации аттенуированными штаммами *F. tularensis*. Мыши линии BALB/c были иммунизированы подкожно в дозе 100 КОЕ/мл штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ, *F. tularensis* 15/23-1 Δ recA и *F. tularensis* 15/23-1/sodB Δ recA (рисунок 4.1).

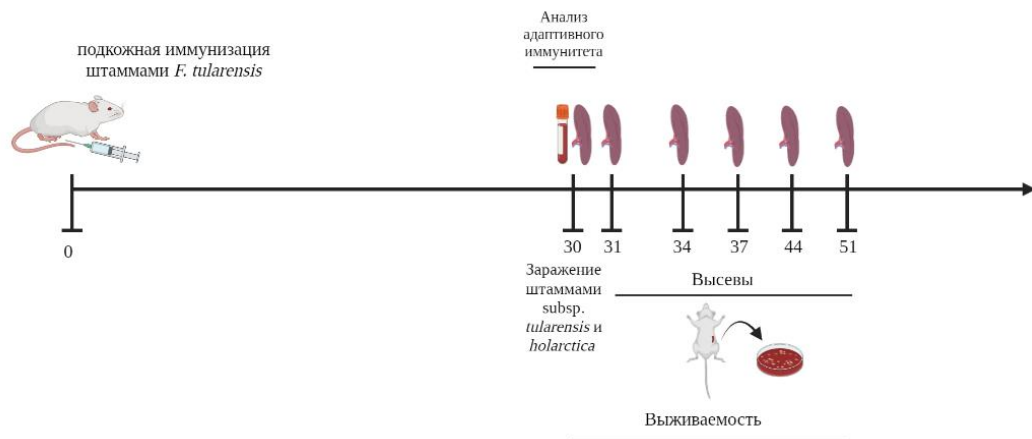


Рисунок 4.1 – Схема экспериментов к Главе 4.

Через 30 сут после вакцинации проводили сравнительный анализ титров специфических к ЛПС *F. tularensis* антител в сыворотке крови и изучали иммунные реакции лимфоцитов селезенки в экспериментах *in vitro* в ответ на стимуляцию туляреминым антигеном. Для изучения субпопуляционного состава лимфоцитов и оценки их функциональной активности была использована проточная цитофлуориметрия. Функциональную активность лимфоцитов оценивали по уровню экспрессии раннего маркера активации CD69, пролиферативному потенциалу и цитокин-продуцирующей активности путем окрашивания внутриклеточных цитокинов IFN- γ и TNF- α . Сравнительный анализ титров специфических антител в сыворотке крови и уровней продукции цитокинов IFN- γ ,

IL-4, IL-10, IL-17A в клеточном супернатанте проводили методом иммуоферментного анализа. Оценку протективных свойств вакцинных препаратов через 30 сут после иммунизации проводили после подкожного инфицирования тест-заражающими природными штаммами *F. tularensis* Schu subsp. *tularensis* и *F. tularensis* 503 subsp. *holarctica*. Оценку тяжести инфекционного процесса проводили по результатам определения обсемененности селезенки после заражения природным штаммом *F. tularensis* Schu.

4.1 Оценка протективных свойств вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производных

Оценка эффективности вакцинных препаратов проводится, прежде всего, по их протективным свойствам на биологических моделях инфекции. На первом этапе исследования мы сравнили протективные свойства аттенуированных штаммов *F. tularensis* после вакцинации мышей линии BALB/с. На 30 сут после вакцинации испытуемыми штаммами мыши были инфицированы в дозе 1000 DCL природными штаммами *F. tularensis* 503 subsp. *holarctica* и *F. tularensis* Schu subsp. *tularensis*. В качестве контроля была использована группа интактных мышей. За животными наблюдали 21 день, оценивая динамику изменения веса после заражения и процент гибели животных. Результаты представлены на рисунке 4.2.

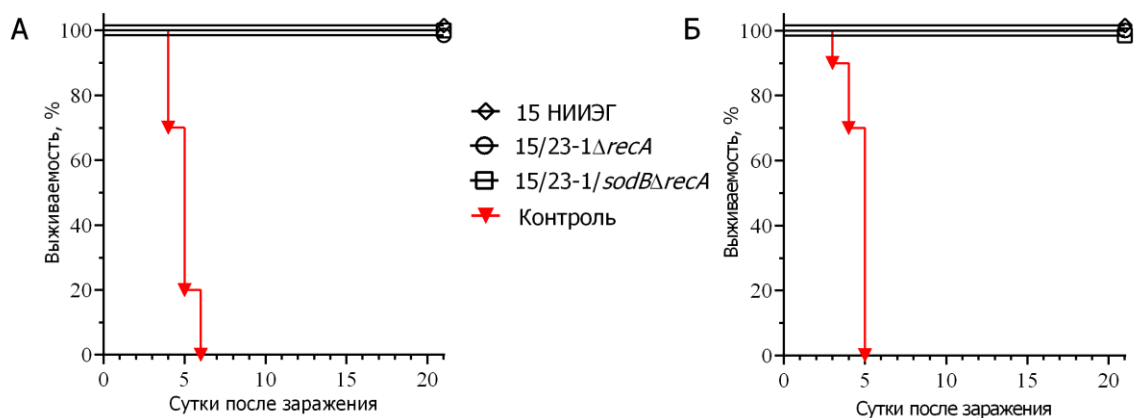


Рисунок 4.2 – Протективные свойства вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производных против заражения природными штаммами *F. tularensis* 503 (А) и *F. tularensis* Schu (Б).

Согласно приведенным данным, иммунизация всеми исследуемыми вакцинными штаммами на 30 сут после вакцинации обеспечивала защиту мышей в 100 % случаев при подкожном заражении природным штаммом *F. tularensis* 503 subsp. *holarctica*. При заражении природным штаммом другого подвида *F. tularensis* Schu subsp. *tularensis* также наблюдалась полная защита всех групп иммунизированных животных.

Сравнительный анализ динамики веса показал, что несмотря на отсутствие погибших животных во всех иммунных группах, при заражении штаммом *F. tularensis* 503 subsp. *holarctica*, мыши незначительно теряли в весе: наибольшее снижение веса (до 1,6 %) наблюдалось на 5 сут в группе животных, вакцинированных штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ (рисунок 4.3 А). Напротив, в группе мышей, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15/23-1/*sodB*Δ*recA*, после заражения природным штаммом *F. tularensis* 503 у животных регистрировалось нарастание веса весь период наблюдения.

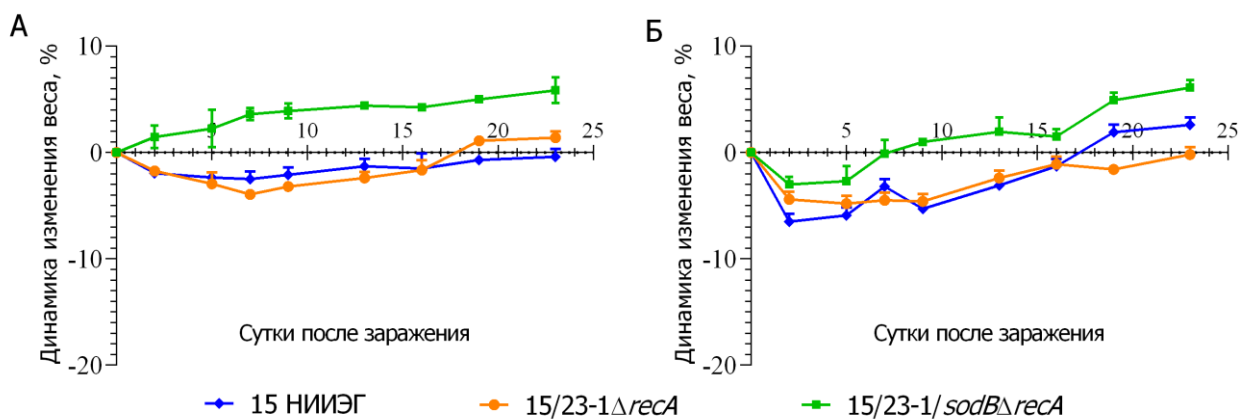


Рисунок 4.3 – Динамика изменения веса мышей линии BALB/c после подкожного заражения природными штаммами *F. tularensis* 503 (А) и Schu (Б) через 30 сут после иммунизации.

Иная картина течения инфекционного процесса наблюдалась в группах иммунных мышей, зараженных природным штаммом *F. tularensis* Schu subsp. *tularensis* (рисунок 4.3 Б). На 30 сут после иммунизации мы не наблюдали гибели мышей после заражения, однако животные также теряли в весе: у мышей, иммунизированных штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA*, до 16 сут наблюдалось снижение веса, тогда как у животных, иммунизированных

штаммом *F. tularensis* 15/23-1/*sodB* Δ *recA*, наблюдалось падение веса только до 5 сут после заражения, которое было незначительным и имело тенденцию к восстановлению.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что все изучаемые вакцинные штаммы через 30 сут после иммунизации эффективно защищают мышей от природных штаммов *F. tularensis* 503 subsp. *holarctica* и *F. tularensis* Schu subsp. *tularensis*.

4.2 Уровень титров специфических антител в сыворотке крови после иммунизации штаммами *F. tularensis*

Задача данного этапа исследования – выявление IgG антител к ЛПС *F. tularensis* в сыворотке крови мышей на 30 сут после иммунизации штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ, *F. tularensis* 15/23-1/*sodB* Δ *recA* и *F. tularensis* 15/23-1 Δ *recA*. В ходе работы был проведен анализ наличия специфических антител к ЛПС *F. tularensis* иммунизированных и интактной групп методом ИФА согласно руководству [173]. Результаты исследования представлены на рисунке 4.4.

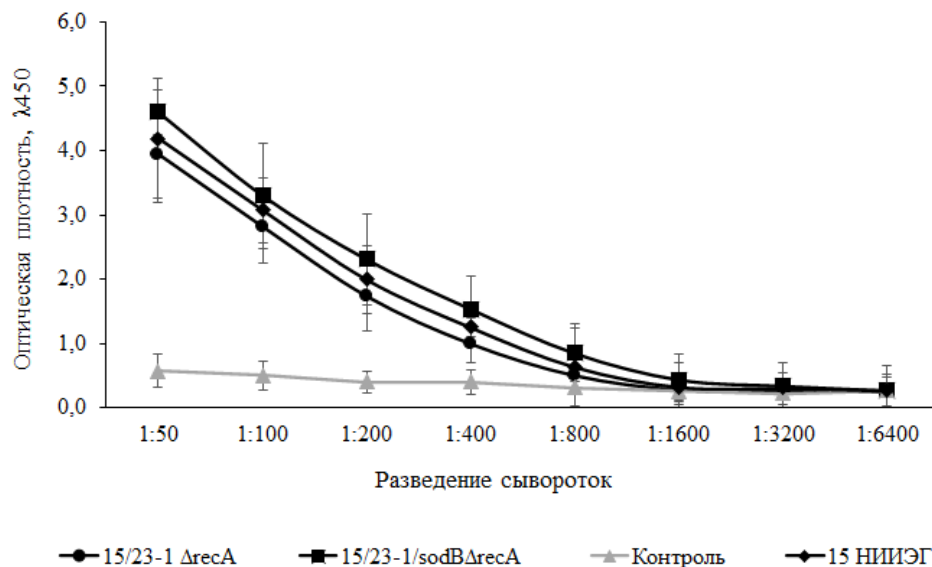


Рисунок 4.4 – Титры IgG антител к ЛПС *F. tularensis* в сыворотке крови мышей линии BALB/c на 30 сут после иммунизации.

На 30 сут после иммунизации вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производными штаммами *F. tularensis* 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 достоверно не различались ($p > 0,05$) между группами вакцинированных животных и составляли 1:400.

4.3 Сравнительный анализ изменения субпопуляционного состава В-клеток в эффекторную фазу иммунного ответа после вакцинации мышей штаммами *F. tularensis*

Задачей данного этапа исследования была оценка влияния иммунизации аттенуированными штаммами *F. tularensis* на функциональную активность В-клеток. Объектом изучения были мыши линии BALB/с, иммунизированные однократно подкожно в дозе 100 КОЕ/мышь штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ, *F. tularensis* 15/23-1 Δ recA и *F. tularensis* 15/23-1/sodB Δ recA. Функциональную активность В-клеток, индуцированную *in vitro* КНК *F. tularensis*, оценивали на 30 сут после иммунизации по следующим параметрам: уровню экспрессии маркеров активации CD69 и CD25, цитокин-продуцирующей активности путем окрашивания внутриклеточных цитокинов IFN- γ и IL-4. Результаты исследований представлены на рисунке 4.5.

Цитометрический анализ данных показал, что иммунизация мышей всеми исследуемыми штаммами индуцировала активацию В-клеток, о чем свидетельствовало достоверное антиген-индуцированное повышение ($p < 0,05$) процентного содержания В-клеток с фенотипом CD19⁺CD69⁺ по сравнению с показателями контрольной группы: после вакцинации *F. tularensis* 15 НИИЭГ – 22,0 % (19,2; 34,6), *F. tularensis* 15/23-1 Δ recA – 20,6 % (16,0; 36,6), *F. tularensis* 15/23-1/sodB Δ recA – 28,0 % (17,3; 29,0), в интактной – 1,2 % (0,6; 2,8).

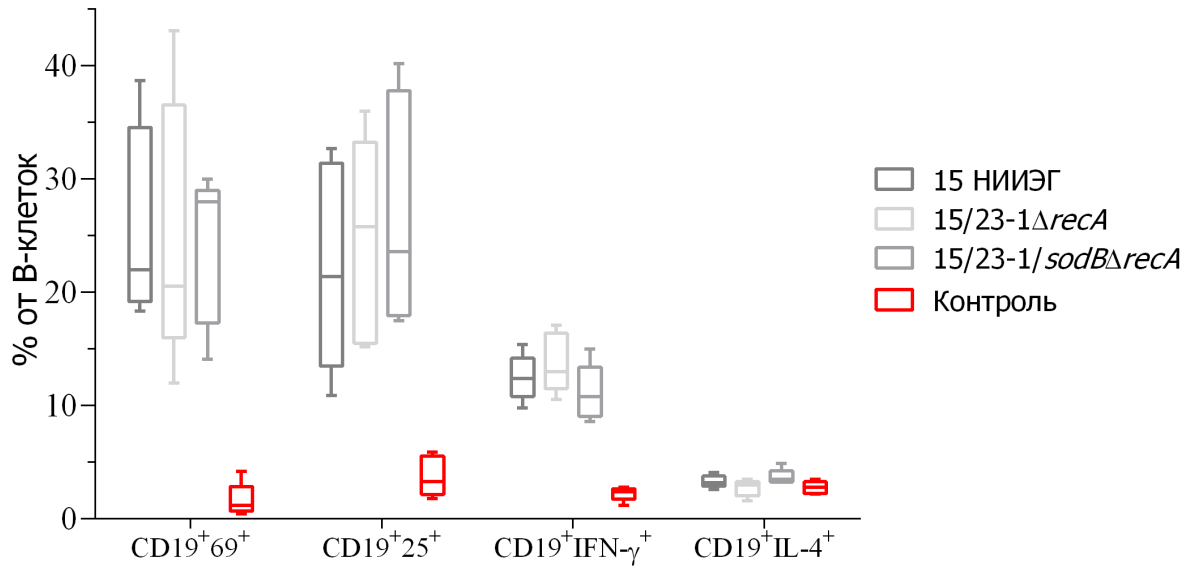


Рисунок 4.5 – Антиген-индуцированное изменение процентного содержания субпопуляций В-клеток у иммунных и интактных мышей линии BALB/c.

Примечание: результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха [Me (Q25:Q75)]. Для сравнения выборок использовался однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA).

При анализе динамики изменения процентного содержания субпопуляции с фенотипом CD19⁺CD25⁺ была выявлена аналогичная тенденция к антиген-индуцированному повышению в группах иммунизированных мышей в сравнении с интактной группой: после вакцинации *F. tularensis* 15 НИИЭГ – 21,4 % (13,5; 31,4), *F. tularensis* 15/23-1ΔrecA – 25,8 % (15,5; 33,3), *F. tularensis* 15/23-1/sodBΔrecA – 23,6 % (18,0; 37,8), в контрольной – 3,3 % (2,1; 5,5).

Сравнительный анализ цитокин-продуцирующей активности В-клеток показал, что в группе интактных мышей при *in vitro* стимуляции клеток КНК не происходило достоверного увеличения IFN-γ⁺ и IL-4⁺ клеток. Во всех группах иммунизированных мышей наблюдалось антиген-индуцированное увеличение процентного содержания IFN-γ-синтезирующих В-клеток: после вакцинации штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ – 12,4 % (10,8; 14,2), *F. tularensis* 15/23-1ΔrecA – 13,0 % (11,5; 16,4), *F. tularensis* 15/23-1/sodBΔrecA – 10,8 % (9,05; 13,4), контроль – 2,4 % (1,7; 2,6). Достоверного ($p > 0,05$) антиген-индуцированного изменения процентного содержания субпопуляции В-клеток с фенотипом CD19⁺IL-4⁺ в группах иммунизированных и интактных животных выявлено не было.

4.4 Сравнительный анализ изменения субпопуляционного состава Т-клеток у мышей в эффекторную фазу иммунного ответа после вакцинации штаммами *F. tularensis*

На следующем этапе исследования стояла задача оценить влияние иммунизации аттенуированными штаммами *F. tularensis* на антиген-индуцированную функциональную активность Т-клеток. Полученные результаты представлены на рисунке 4.6.

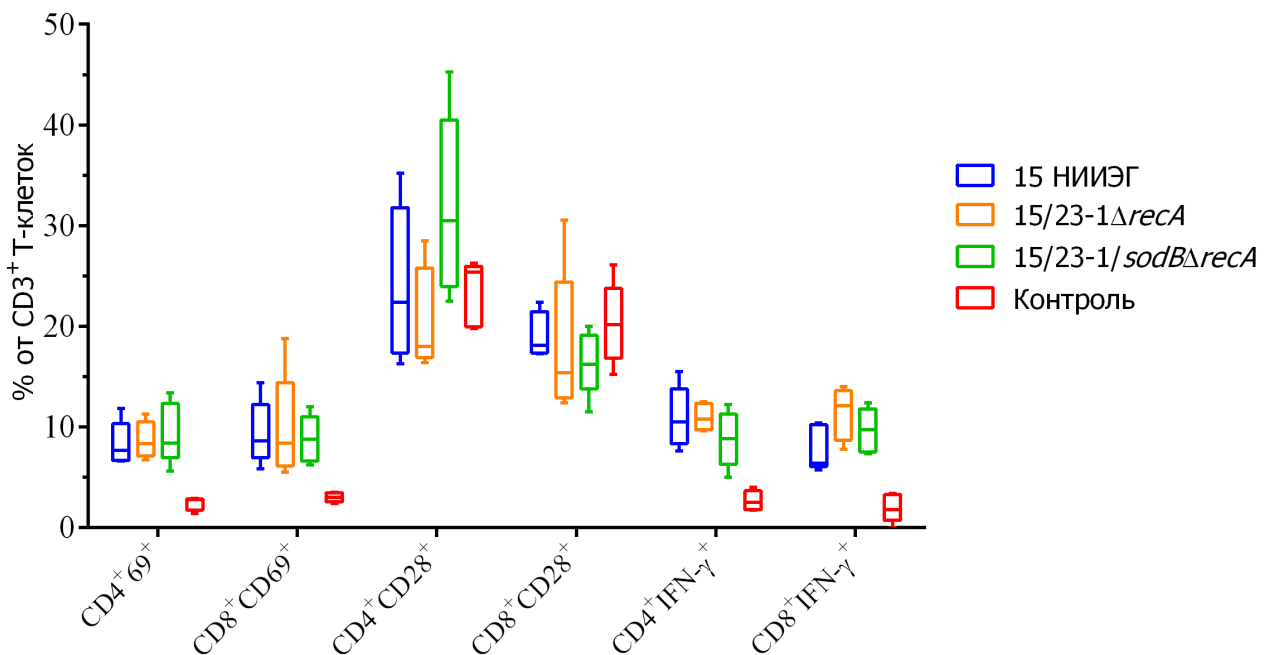


Рисунок 4.6 – Антиген-индуцированное изменение процентного содержания субпопуляций Т-клеток у иммунных и интактных мышей линии BALB/c.

Примечание: результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха [Me (Q25:Q75)]. Для сравнения выборок использовался однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA).

Цитометрический анализ данных показал, что во всех группах иммунизированных мышей происходит антиген-индуцированное повышение процентного содержания активированных и цитокин-продуцирующих Т-клеток. В частности, анализ уровня экспрессии маркеров активации отдельных субпопуляций Т-клеток показал, что при *in vitro* стимуляции туляремийным антигеном возрастало относительное содержание Т-хелперов с фенотипом CD3⁺CD4⁺CD69⁺ у всех иммунных мышей в сравнении с интактной группой: после

вакцинации штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ – 7, 65 % (6,65; 10,3), штаммом 15/23-1 Δ recA – 8,32 % (7,1; 10,5), штаммом 15/23-1/sodB Δ recA – 8,4 % (7,0; 12,3), контроль – 2,8 % (1,7; 2,9). Анализ субпопуляции цитотоксических Т-лимфоцитов выявил антиген-индуцированное увеличение клеток с фенотипом CD3⁺CD8⁺CD69⁺ у всех иммунизированных мышей: после вакцинации *F. tularensis* 15 НИИЭГ – 8,6 % (6,9; 12,2), *F. tularensis* 15/23-1 Δ recA – 8,4 % (6,1; 14,4), *F. tularensis* 15/23-1/sodB Δ recA – 8,8 % (6,6; 11,0), контроль – 3,0 % (2,5; 3,4).

В ходе дальнейших исследований был проведен анализ уровня экспрессии корцептора CD28 на поверхности CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток. Однако статистически значимых различий ($p > 0,05$) между группами иммунизированных и группой интактных животных в процентном содержании клеток с фенотипом CD4⁺CD28⁺ и CD8⁺CD28⁺ зарегистрировано не было.

Далее в наших экспериментах мы проводили анализ процентного содержания цитокин-продуцирующих Т-клеток. Цитометрический анализ процентного содержания цитокин-продуцирующих Т-клеток показал, что во всех группах иммунных мышей наблюдалось достоверное ($p < 0,05$) антиген-индуцированное повышение синтеза IFN- γ как Т-хелперами, так цитотоксическими Т-лимфоцитами в сравнении с показателями контрольной группы. Уровень секреции IL-4 Т-клетками достоверно ($p > 0,05$) не изменялся под влиянием антигена и был сопоставим с аналогичными данными контрольной группы мышей.

4.5 Оценка изменения уровня цитокинов в клеточном супернатанте лимфоцитов через 30 сут после иммунизации мышей штаммами *F. tularensis*

На следующем этапе работы был проведен сравнительный анализ уровней продукции цитокинов IFN- γ , IL-17A, IL-10 и IL-4 в клеточном супернатанте лимфоцитов иммунных и интактных мышей линии BALB/с. Мышей иммунизировали вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производными штаммами *F. tularensis* 15/23-1/sodB Δ recA и 15/23-1 Δ recA. На 30 сут после иммунизации в экспериментах *in vitro* в клеточном супернатанте

лимфоцитов оценивали синтез цитокинов, индуцированный КНК *F. tularensis* в концентрации 10 мкг/мл. Через 48 ч инкубации лимфоцитов с туляреминым антигеном отбирали клеточный супернатант и определяли в нем концентрацию цитокинов IFN- γ , IL-17A, IL-10 и IL-4 методом непрямого твердофазного ИФА с использованием коммерческих наборов согласно инструкции производителя (BD Biosciences, США). Отрицательным контролем выступали клетки, инкубируемые в среде и отсутствии антигена. Результаты экспериментов представлены на рисунке 4.7.

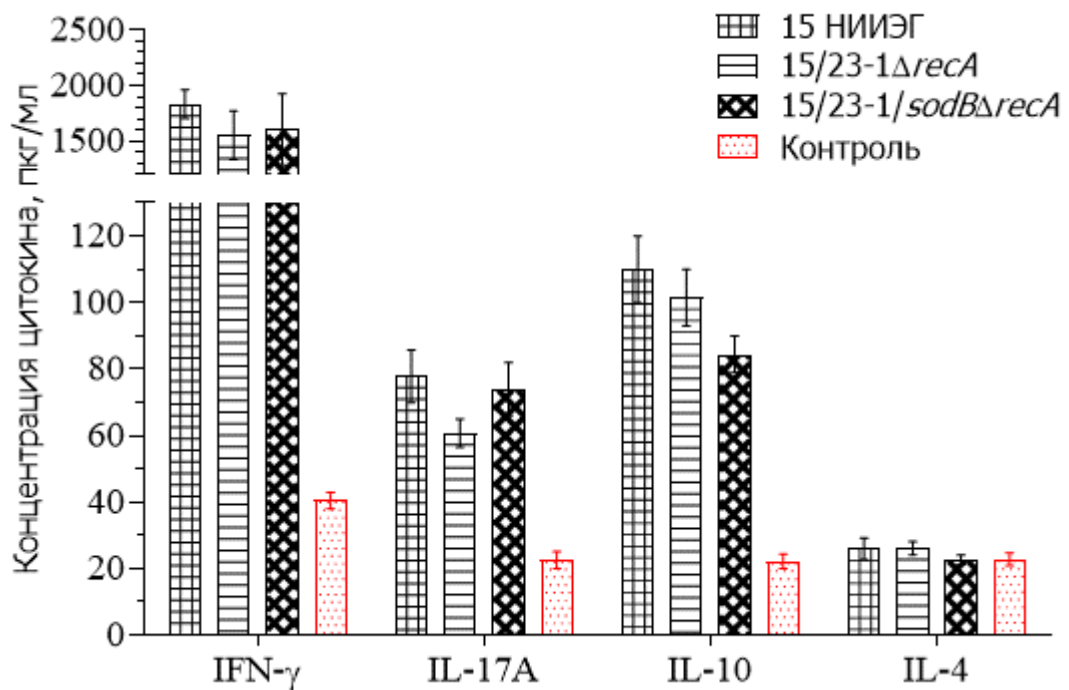


Рисунок 4.7 – Концентрация цитокинов в клеточном супернатанте лимфоцитов мышей линии BALB/c после иммунизации штаммами *F. tularensis*.

Примечание: Результаты представлены в виде среднеарифметического значения группы и его стандартного отклонения.

Во всех группах иммунизированных животных мы наблюдали наиболее выраженное повышение (в 38,8 – 45,8 раза) уровня IFN- γ на 30 сут после вакцинации в сравнении с интактной группой животных. Однако статистически значимых различий между группами иммунных животных обнаружено не было.

Сравнительный анализ уровня IL-17A показал, что на 30 сут после вакцинации имело место незначительное (в 2,6 – 3,4 раза) увеличение синтеза цитокина во всех иммунных группах мышей в сравнении с интактной группой

животных, статистически значимых различий между иммунными группами животных выявлено не было. Уровень IL-10 на 30 сут иммуногенеза был выше в группах мышей, иммунизированных *F. tularensis* 15 НИИЭГ (в 5 раз) и *F. tularensis* 15/23-1 Δ recA (в 4,6 раза), в сравнении с контрольной группой животных, а в группе мышей, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15/23-1/*sodB* Δ recA концентрация данного цитокина повышалась в 3,8 раза. Уровень секреции IL-4 не изменялся в группах иммунных животных при стимуляции клеток *in vitro* туляреминым антигеном и был сопоставим с интактной группой. Таким образом, наличие в клеточном супернатанте таких цитокинов как IFN- γ , IL-17A и IL-10, вероятно, указывает на смешанный иммунный ответ по Th1/Th2 пути.

4.6 Влияние вакцинации штаммами *F. tularensis* на генерацию и функциональную активность Т-клеток памяти у мышей линии BALB/c

При изучении иммунного ответа клеточного типа, обеспечивающего формирование защиты от внутриклеточных инфекций вирусного и бактериального происхождения, особое значение придается анализу влияния вакцинации на генерацию и функциональную активность CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток памяти [38, 91, 139, 263, 250]. Т-клетки памяти обладают высокой специфичностью к антигену, фенотипической и функциональной неоднородностью, которые на основании экспрессии CD62L делят на две субпопуляции: T_{ЕМ} и T_{СМ} клетки памяти [248]. Работы, в которых проводилась оценка вклада субпопуляций T_{ЕМ} и T_{СМ} клеток памяти в формирование специфического поствакцинального иммунитета, весьма противоречивы. Угасание напряженности противотуберкулезного иммунитета после иммунизации вакциной БЦЖ (BCG, Bacillus Calmette–Guérin) связывают именно со снижением количества пула долгоживущих T_{СМ} памяти [177, 204]. Исследования по изучению противовирусного иммунитета показали, что спустя десятилетия после вакцинации против оспы детектировались специфические пролиферирующие T_{ЕМ} клетки памяти [84], в то время как иммунизация вакциной против гепатита В индуцировала формирование напряженного иммунитета и

генерацию специфических T_{CM} , обладающих высоким пролиферативным потенциалом и способных продуцировать несколько цитокинов, включая IFN- γ [259].

На данном этапе работе мы детально изучили влияние иммунизации аттенуированными штаммами *F. tularensis* на генерацию антигенспецифических T_{CM} и T_{EM} клеток памяти с фенотипом $CD4^+$ и $CD8^+$, и их функциональную активность, что позволило детально охарактеризовать вклад каждой субпопуляции в формирование протективного противотулярийного иммунитета. Идентификацию, анализ фенотипа и функциональную активность Т-клеток памяти проводили методом многоцветной проточной цитометрии на 30 сут иммуногенеза в экспериментах *in vitro*, стимулируя клетки антигеном *F. tularensis*. T_{EM} клетки памяти идентифицировали как $CD3^+CD4^+CD44^+CD62L^-$ и $CD3^+CD8^+CD44^+CD62L^-$, T_{CM} клетки памяти как $CD3^+CD4^+CD44^+CD62L^+$ и $CD3^+CD8^+CD44^+CD62L^+$, соответственно. Функциональную активность Т-клеток памяти оценивали по следующим параметрам: уровню экспрессии раннего маркера активации CD69, пролиферативному потенциалу клеток путем окрашивания CFSE, цитокин-продуцирующей активности путем окрашивания внутриклеточных цитокинов IFN- γ и TNF- α .

4.6.1 Анализ субпопуляционного состава Т-клеток памяти

Важное звено для формирования протективного иммунитета против внутриклеточных бактерий *F. tularensis* – клеточный иммунитет, основанный на специфических реакциях субпопуляций Т-клеток, который, в конечном счете, приводит к формированию пула клеток памяти. В связи с этим для разработки новых вакцинных противотулярийных препаратов необходимо понимать фенотип и функции Т-клеток памяти, обеспечивающих иммунологическую эффективность потенциальных вакцин [228]. Согласно литературным данным, Т-клетки памяти по функциям и по фенотипу разделяют на популяции T_{CM} и T_{EM} клетки памяти, различающихся экспрессией хемокинового рецептора CD62L [139]. T_{CM} клетки экспрессируют на своей поверхности рецептор CD62L, который

необходим для экстравазации клеток через эндотелий сосудов и миграции во вторичные лимфоидные органы, имеют слабо выраженную эффекторную функцию, но легко пролиферируют и дифференцируются в эффекторные клетки в ответ на антигенную стимуляцию. Т_{ЕМ} клетки памяти, у которых отсутствует экспрессия CD62L, обеспечивают немедленную защиту организма, мигрируя в очаги воспаления и проявляют свою эффекторную функцию посредством синтеза цитокинов и цитотоксического эффекта [139, 169, 236]. Исследования, проведенные на мышах BALB/с, показали, что для формирования протективного противотуляремийного иммунитета необходимы как CD4⁺, так и CD8⁺ Т-клетки [85, 280], но до настоящего момента остается неизвестным функции Т-клеток памяти и их фенотип, необходимые для формирования протективного иммунитета против природных штаммов *F. tularensis*.

Изогенные штаммы *F. tularensis* 15 НИИЭГ, полученные в результате модификаций вакцинного штамма, характеризуются одинаковой с ним протективностью, но меньшей реактогенностью [16, 31]. В данной работе мы проанализировали и сравнили особенности Т-клеток памяти, сформированных в ответ на иммунизацию мышей вакцинными штаммами *F. tularensis*. На основании уровня экспрессии поверхностных антигенов CD62L, CD44, CD4 и CD8 методом проточной цитофлуометрии нами был проведен сравнительный анализ фенотипа и эффекторных функций Т-клеток памяти на 30 сут после иммунизации аттенуированными штаммами *F. tularensis* в ответ на стимуляцию клеток *in vitro* туляремийным антигеном.

В результате проведенного сравнительного анализа полученных данных выявлено, что в селезенках исследуемых групп иммунизированных животных пул специфических Т-клеток памяти представлен преимущественно подмножеством Т_{ЕМ} (рисунок 4.8).

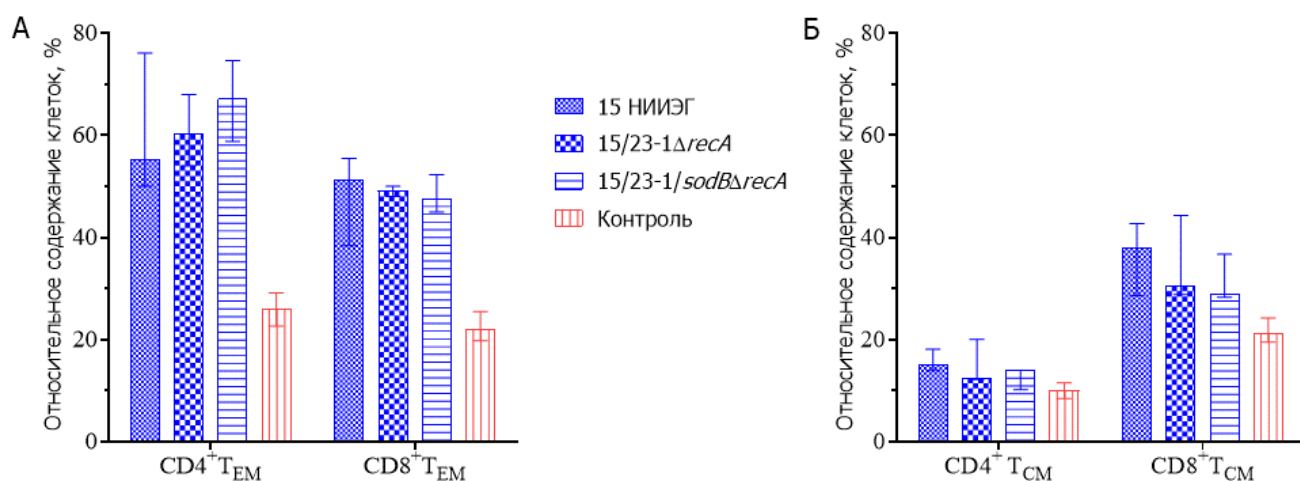


Рисунок 4.8 – Доля T_{ЕМ} (А) и T_{СМ} (Б) клеток памяти среди общего числа CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток в селезенке мышей линии BALB/c через 30 сут после их иммунизации аттенуированными штаммами *F. tularensis*.

Иммунизация каждым из исследуемых штаммов приводила к достоверному увеличению ($p=0,04$) процентного содержания клеток CD4⁺ T_{ЕМ} (рисунок 4.8 А) в сравнении с контрольной группой мышей: после вакцинации *F. tularensis* 15 НИИЭГ – 55,2 % (50,0; 76,1), *F. tularensis* 15/23-1ΔrecA – 60,2 % (54,0; 68,0), *F. tularensis* 15/23-1/sodBΔrecA – 67,1 % (58,8; 74,6), у интактных – 22,0 % (19,8; 25,5). Во всех группах иммунизированных животных также выявлено достоверное увеличение ($p=0,04$) процентного содержания клеток CD8⁺ T_{ЕМ}: после вакцинации *F. tularensis* 15 НИИЭГ – 51,3 % (38,4; 55,5), *F. tularensis* 15/23-1ΔrecA – 49,1 % (48,0; 50,0), *F. tularensis* 15/23-1/sodBΔrecA – 47,5 % (45,0; 52,3), у интактных – 26,0 % (22,7; 29,1). При инкубации в отсутствие антигена не обнаружили увеличения этих субпопуляций Т-клеток памяти, выделенных из иммунизированных животных. На основании этих данных можно сделать вывод, что повышение процентного содержания клеток CD4⁺ и CD8⁺ T_{ЕМ} происходит антигензависимым и специфическим образом (данные не приведены). Сравнительный анализ субпопуляций клеток T_{СМ} показал, что процентное содержание субпопуляции CD4⁺ T_{СМ} достоверно не различалось ($p > 0,05$) между иммунизированными и интактными животными (рисунок 4.8 А). Однако во всех группах иммунизированных животных наблюдали достоверное увеличение ($p = 0,04$) клеток CD8⁺ T_{СМ}: после вакцинации *F. tularensis* 15 НИИЭГ – 38,0 % (28,6;

42,7), *F. tularensis* 15/23-1 Δ *recA* – 30,5 % (28,8; 44,3), *F. tularensis* 15/23-1/*sodB* Δ *recA* – 29,0 % (28,3; 36,7), у интактных медиана составляла 21,1 % (19,5; 24,3).

В исследованиях по изучению поствакцинального иммунитета при внутриклеточных инфекциях было показано, что персистенция патогенов приводит к истощению T_{CM} клеток и постоянной генерации T_{EM} клеток, что позволяет рассматривать их в качестве критерия, отражающего протективность вакцины [104, 244, 269]. Напротив, в других работах было выявлено, что защита и контроль над инфекцией коррелировали с наличием $CD4^+$ и $CD8^+$ T_{CM} клеток памяти [140, 151, 179]. Следовательно, для формирования протективного длительного иммунитета против внутриклеточных инфекций необходимо наличие как T_{CM} , так и T_{EM} . В нашем исследовании иммунизация аттенуированными штаммами *F. tularensis* приводила к увеличению T_{EM} с фенотипами $CD4^+$ и $CD8^+$, а также T_{CM} с фенотипом $CD8^+$ на 30 сут после иммунизации, что обеспечивает 100 % защиту иммунных мышей от природных штаммов *F. tularensis* подвидов *tularensis* и *holartica*.

Функциональную активность субпопуляций Т-клеток памяти оценивали по уровню экспрессии CD69 молекулы, являющейся ранним маркером активации клеток и участвующей в регуляции эффекторной функции лимфоцитов [271, 276]. Результаты представлены на рисунке 4.9.

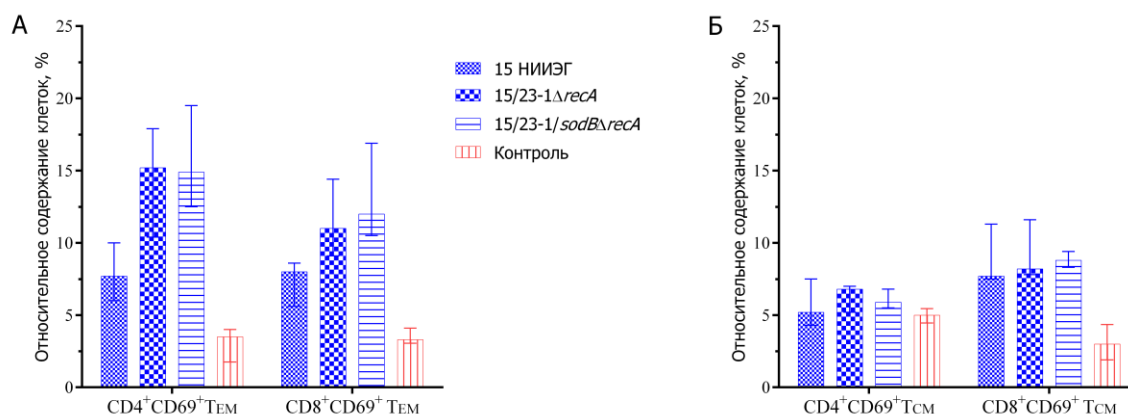


Рисунок 4.9 – Доля активированных T_{EM} (А) и T_{CM} (Б) клеток памяти от общего числа $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток в селезенке мышей линии BALB/c через 30 сут после иммунизации аттенуированными штаммами *F. tularensis*.

Анализ уровня экспрессии CD69 на поверхности клеток T_{EM} показал, что иммунизация исследуемыми штаммами приводила к достоверному увеличению ($p=0,04$) активированных клеток T_{EM} с фенотипами $CD8^+CD69^+$ и $CD4^+CD69^+$ в сравнении с интактной группой (рисунок 4.9 А). Статистически значимых различий ($p > 0,05$) между группами иммунизированных животных не выявлено. Однако более выраженное увеличение этих субпопуляций зарегистрировано у мышей, вакцинированных штаммом *F. tularensis* 15/23-1 Δ recA: для $CD8^+$ T_{EM} медиана составила 11,0 % (9,1; 14,4), для $CD4^+$ T_{EM} – 15,2 % (10,4; 17,9), – и штаммом *F. tularensis* 15/23-1/sodB Δ recA: для $CD8^+$ T_{EM} медиана – 12,0 % (10,5; 16,9), для $CD4^+$ T_{EM} – 14,9 % (12,5; 19,5) – в сравнении с исходным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ: 8,0 % (5,6; 8,6) и 7,7 % (6,0; 10,0) для $CD8^+$ и $CD4^+$ T_{EM} соответственно.

В сравнении с интактной группой во всех группах иммунизированных животных наблюдали достоверное увеличение активированных клеток T_{CM} (рисунок 4.9 Б) с фенотипом $CD8^+CD69^+$: после иммунизации *F. tularensis* 15 НИИЭГ – 38,0 % (28,6; 42,7), *F. tularensis* 15/23-1 Δ recA – 30,5 % (28,8; 44,3), *F. tularensis* 15/23-1/sodB Δ recA – 29,0 % (28,3; 36,7), контроль – 21,1 % (19,5; 24,3). По результатам сравнительного анализа процентное содержание субпопуляции $CD4^+CD69^+$ T_{CM} клеток незначительно повышено у иммунизированных животных по сравнению с интактной группой, однако статистически значимых различий ($p > 0.05$) не обнаружено.

Таким образом, можно заключить, что иммунизация всеми аттенуированными вакцинными штаммами *F. tularensis* приводит к формированию иммунологической памяти посредством генерации пулов T_{EM} и T_{CM} клеток памяти, а также специфической активации клеток с фенотипами $CD8^+CD69^+$ T_{CM} , $CD8^+CD69^+$ T_{EM} и $CD4^+CD69^+$ T_{EM} .

4.6.2 Анализ цитокин-продуцирующей активности Т-клеток памяти

На следующем этапе исследования мы определяли эффекторную функцию Т-клеток памяти путем окрашивания внутриклеточных цитокинов IFN- γ и TNF- α на

30 сутки после иммунизации аттенуированными штаммами *F. tularensis*. В качестве специфического индуктора в экспериментах *in vitro* использовали туляреминый антиген. Полученные результаты приведены на рисунке 4.10.

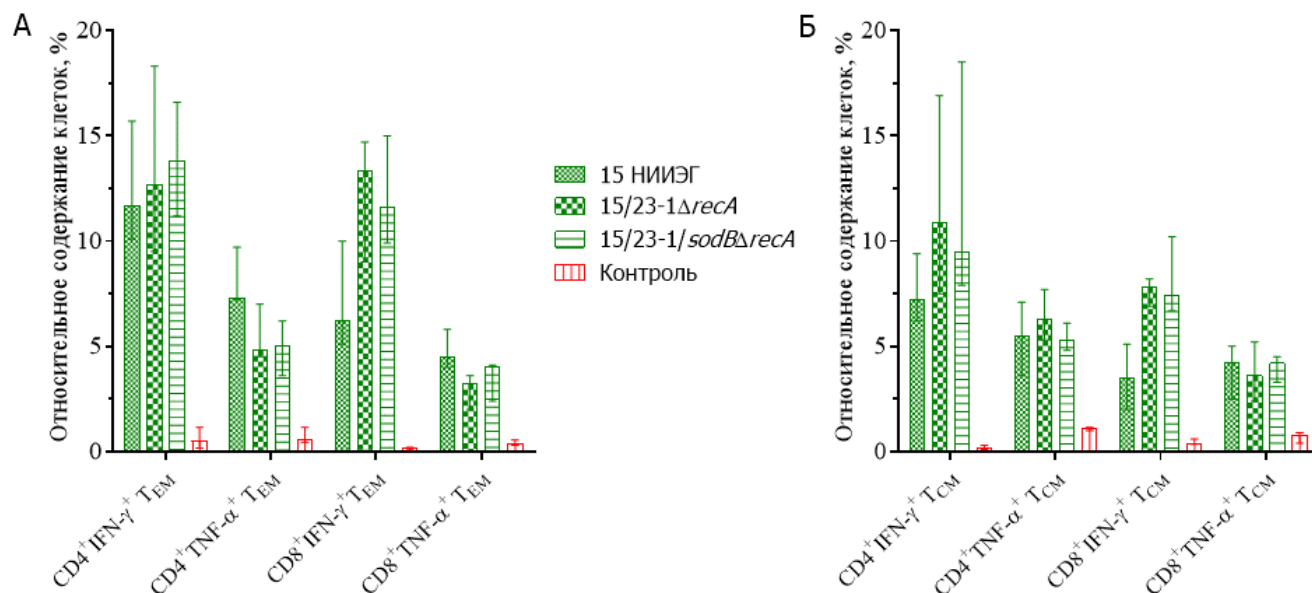


Рисунок 4.10 – Доля цитокин-продуцирующих Т_{ЕМ} (А) и Т_{СМ} (Б) клеток памяти среди общего числа CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток в селезенке мышей линии BALB/c через 30 сут после иммунизации аттенуированными штаммами *F. tularensis*.

Сравнительный анализ субпопуляций Т-клеток памяти, секретирующих IFN-γ и TNF-α, выявил статистически значимое антиген-индуцированное увеличение относительного содержания субпопуляций CD4⁺ и CD8⁺ как Т_{ЕМ}, так и Т_{СМ} клеток у всех иммунизированных животных по сравнению с интактной группой. Иммунизация всеми исследуемыми штаммами приводила к статистически значимому ($p=0,04$) повышению процентного содержания клеток Т_{ЕМ} с фенотипом CD4⁺IFN-γ⁺ в сравнении с интактной группой: *F. tularensis* 15 НИИЭГ – 11,7 % (10,1; 15,7), *F. tularensis* 15/23-1ΔrecA – 12,7 % (9,5; 18,3), *F. tularensis* 15/23-1/sodBΔrecA – 13,8 % (11,2; 16,6), контроль – 0,5 % (0,2; 1,1). Статистически значимых различий между иммунизированными группами животных не выявлено (рисунок 4.10 А). Анализ Т-клеток памяти с фенотипом CD8⁺ Т_{ЕМ} показал, что процентное содержание этих клеток, секретирующих IFN-γ, статистически значимо выше ($p=0,02$) при иммунизации рекомбинантными штаммами *F. tularensis* 15/23-1ΔrecA (медиана 13,3 % (9,0; 14,7)) и *F. tularensis* 15/23-

1/*sodBΔrecA* (медиана 11,6 % (9,9; 15,0)), чем для штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ (медиана 6,2 % (5,1; 10,0)). Напротив, у вакцинированных *F. tularensis* 15 НИИЭГ отмечалось более выраженное увеличение процентного содержания субпопуляции $CD4^+TNF-\alpha^+$ T_{EM} (медиана 7,3 % (7,2; 9,7)), а у иммунизированных *F. tularensis* 15/23-1 Δ *recA* (медиана 4,8 % (4,5; 7,0) и *F. tularensis* 15/23-1/*sodBΔrecA* (медиана 5,0 % (3,6; 6,2) – умеренная продукция $TNF-\alpha$ этой субпопуляцией Т-клеток памяти. Однако статистически значимых различий в синтезе $IFN-\gamma$ и $TNF-\alpha$ субпопуляциями $CD4^+$ и $CD8^+$ T_{EM} в группах иммунизированных животных не обнаружено.

Сравнительный анализ показал, что вакцинация исследуемыми штаммами приводила к статистически значимому увеличению ($p=0,02$) субпопуляций $CD4^+$ и $CD8^+$ T_{CM} , синтезирующих $IFN-\gamma$ (рисунок 4.10 Б). Примечательно, что иммунизация рекомбинантными штаммами *F. tularensis* 15/23-1 Δ *recA* и *F. tularensis* 15/23-1/*sodBΔrecA* приводила к более выраженному увеличению процентного содержания T_{CM} клеток $CD4^+IFN-\gamma^+$ и $CD8^+IFN-\gamma^+$ в сравнении с исходным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ. В группе мышей, иммунизированных *F. tularensis* 15/23-1 Δ *recA*, медиана субпопуляции T_{CM} с фенотипом $CD4^+IFN-\gamma^+$ составляла 10,9 % (7,5; 6,9), в группе *F. tularensis* 15/23-1/*sodBΔrecA* – 9,5 % (7,9; 18,5), в группе *F. tularensis* 15 НИИЭГ – 7,2 % (6,2; 9,4), в интактной – 0,2 % (0,1; 0,3). После иммунизации исходным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ медиана субпопуляции T_{CM} с фенотипом $CD8^+IFN-\gamma^+$ составляла 3,5% (2,0; 5,1), после вакцинации рекомбинантными штаммами *F. tularensis* 15/23-1 Δ *recA* и *F. tularensis* 15/23-1/*sodBΔrecA* – 7,8% (6,9; 8,2) и 7,4 % (6,7; 10,2) соответственно. Статистически значимых различий в уровне синтеза $TNF-\alpha$ субпопуляциями T_{CM} клеток между группами вакцинированных животных не выявлено.

4.6.3 Анализ пролиферативной активности Т-клеток памяти

Усиление пролиферации лимфоцитов в ответ на их стимуляцию *in vitro* антигенами отражает специфическую активацию клеток и может использоваться для изучения поствакцинального иммунитета [263]. На 30 сут иммуногенеза мы

оценивали цитофлуориметрически способность лимфоцитов к спонтанной и индуцированной КНК *in vitro* пролиферации с использованием метода, основанного на окрашивании внутриклеточного белка витальным флуоресцентным красителем CFSE. После окончания пятидневной инкубации лимфоциты окрашивали моноклональными антителами против поверхностных CD-антигенов и анализировали пролиферативную активность $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток. Результаты исследования представлены на рисунке 4.11.

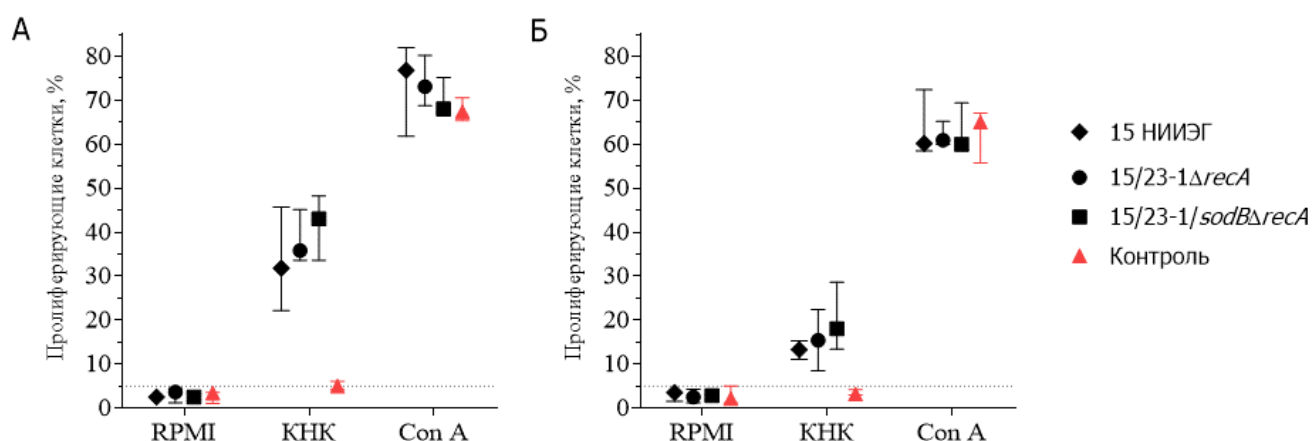


Рисунок 4.11 – Сравнительная оценка спонтанной и индуцированной *in vitro* туляреминым антигеном пролиферативной активности $CD4^+$ (А) и $CD8^+$ (Б) Т-клеток у вакцинированных и интактных мышей линии BALB/c.

Сравнительный анализ полученных результатов показал, что во всех группах иммунных животных мы наблюдали достоверное ($p < 0,05$) антиген-индуцированное увеличение пролиферативной активности лимфоцитов в сравнении с интактной группой животных. Однако статистически значимых различий между группами иммунных мышей не наблюдалось. Стимуляция туляреминым антигеном лимфоцитов, выделенных от мышей интактной группы, не влияла на пролиферативную активность Т-клеток. Таким образом, вакцинация всеми исследуемыми штаммами приводила к увеличению пролиферативной активности субпопуляций $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток.

4.7 Влияние иммунизации штаммами *F. tularensis* на обсемененность селезенки мышей после заражения природным штаммом *F. tularensis* Schu

Результативной составляющей поствакцинального иммунитета при изучении экспериментальной туляремии на мышинной модели является контроль за развитием инфекционного процесса, критерием которого может служить оценка обсемененности селезенки животных после заражения природным штаммом *F. tularensis* Schu. Этот показатель позволяет оценить эффективность иммунной защиты для каждого из исследуемых вакцинных штаммов. Результаты исследования представлены на рисунке 4.12.

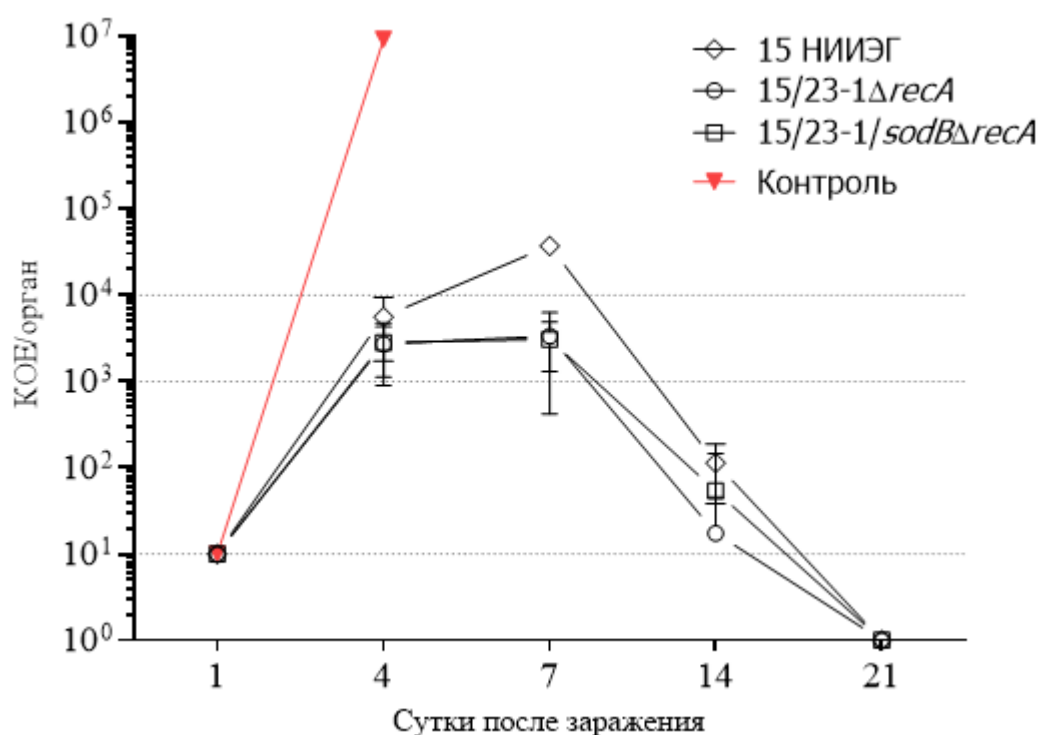


Рисунок 4.12 – Обсемененность селезенки после заражения мышей линии BALB/c штаммом *F. tularensis* Schu на 30 сут после вакцинации аттенуированными штаммами *F. tularensis*.

Несмотря на 100 % выживаемость экспериментальных мышей после заражения природным штаммом *F. tularensis* Schu, наши дальнейшие исследования выявили явные различия в способности животных контролировать инфекцию. На начальном этапе развития инфекции (4 день после заражения) в селезенках мышей иммунных групп мы наблюдали значительно меньше бактерий в сравнении с

интактной группой мышей: у животных, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ обсемененность составила $5,5 \cdot 10^3 \pm 3,8 \cdot 10^3$ КОЕ/орган; *F. tularensis* 15/23-1 Δ recA – $2,7 \cdot 10^3 \pm 1,6 \cdot 10^3$ КОЕ/орган; *F. tularensis* 15/23-1/sodB Δ recA – $2,8 \cdot 10^3 \pm 1,9 \cdot 10^3$ КОЕ/орган; интактных – $9,1 \cdot 10^6 \pm 9,6 \cdot 10^6$ КОЕ/орган. Следует отметить, что на 4 сутки инфекционного процесса у мышей, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, обсемененность селезенки была в 2 раза выше, чем в группах иммунизированных мышей штаммами *F. tularensis* 15/23-1 Δ recA или *F. tularensis* 15/23-1/sodB Δ recA. Все интактные животные погибали на 5 сут инфекционного процесса, что свидетельствовало о генерализации процесса в отличие от иммунных животных. Максимальные различия между группами наблюдали на 7 сут после инфицирования – в группе мышей, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ наблюдалась обсемененность органов на один порядок больше и составила $3,7 \cdot 10^4 \pm 6,5 \cdot 10^3$ КОЕ/орган в сравнении с двумя другими группами иммунных животных: *F. tularensis* 15/23-1 Δ recA – $3,3 \cdot 10^3 \pm 2,9 \cdot 10^3$ КОЕ/орган; *F. tularensis* 15/23-1/sodB Δ recA – $3,0 \cdot 10^3 \pm 1,7 \cdot 10^3$ КОЕ/орган, соответственно. К 14 сут после заражения мы наблюдали минимальную обсемененность селезенки: в группе иммунизированных мышей штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ обсемененность в 1,5-2 раза была выше в сравнении с двумя другими группами иммунных животных. К 21 дню после заражения мы наблюдали отсутствие бактерий, что свидетельствует о контроле над инфекцией.

4.8 Заключение по Главе 4

В своем исследовании по моделированию экспериментальной туляремии на мышах мы показали, что иммунизация вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и рекомбинантными штаммами *F. tularensis* 15/23-1 Δ recA и *F. tularensis* 15/23-1/sodB Δ recA, приводит к формированию протективного иммунитета. Вакцинация данными исследуемыми штаммами эффективно защищает мышей от заражения гомологичным природным штаммом

F. tularensis 503 подвида *holarctica* и штаммом *F. tularensis* Schu гетерологичного подвида *tularensis* через 30 сут после иммунизации.

Результаты наших экспериментов показали, что после иммунизации вакцинным штаммом и его производными, на 30 сут после иммунизации в сыворотке крови животных детектировались антитела к ЛПС *F. tularensis* и их уровень достоверно не различался между группами и колебались в пределах 1:400÷1:800. Известно, что специфические антитела к антигенам *F. tularensis* играют вспомогательную роль в борьбе с инфекцией, усиливая Т-клеточный ответ посредством опсонизации бактерий [226]. В связи с тем, что большая часть жизнедеятельности бактерий *F. tularensis*, включая репликацию, проходит внутриклеточно, уровень антител не коррелирует с протективностью противотуляремийного иммунитета. Поэтому мы попытались выявить особенности специфических клеточных реакций лимфоцитов у иммунных мышей.

Хотя для возбудителей внутриклеточных инфекций ведущая роль принадлежит Т-клеточному звену иммунитета, эксперименты, проведенные с knock-out мышами с использованием природного штамма *F. tularensis* SchuS4 показали, что выживаемость мышей при туляреминой инфекции коррелировала с участием не только Т-клеток ($\alpha\beta\text{TCR}^+$ и $\gamma\delta\text{TCR}^+$), но также и с участием В-клеток [96]. В-клетки способны регулировать специфические иммунные реакции с помощью дополнительных, независимых от антител механизмов [107, 143, 277]. В наших *in vitro* экспериментах было выявлено, что под влиянием КНК В-лимфоциты всех групп иммунных животных стремительно активировались, о чем свидетельствовало увеличение пула клеток, экспрессирующих CD69 рецептор, активирующий эффекторную функцию лимфоцитов [271], и CD25 молекулу – лиганд IL-2, который при связывании усиливает пролиферативную активность клетки [36]. Формирование защитных клеточных реакций против *F. tularensis* зависит от наличия В-клеток, способных синтезировать IFN- γ , на ранних этапах иммунного ответа [97]. При этом необходимость участия В-клеток в формировании иммунного ответа зависит от уровня вирулентности штамма *F. tularensis*: чем выше вирулентность, тем более востребовано проявление эффекторной функции данной

субпопуляцией лимфоцитов [93, 108]. В ходе собственных экспериментов нами было показано, что во всех группах иммунных мышей под влиянием КНК отмечалось увеличение процентного содержания В-клеток, синтезирующих IFN- γ , но не IL-4. Таким образом, у всех иммунных мышей уровни вовлеченности В-клеток в формирование противотуляремийного иммунитета не различались между собой.

При туляремийной инфекции важна роль Т-хелперов и цитотоксических лимфоцитов – исключение одной из этих субпопуляций Т-клеток приводит к гибели иммунных мышей [228]. При сравнительном анализе цитокинов методом внутриклеточного окрашивания нами было выявлено, что в ответ на иммунизацию и *in vitro* стимуляцию туляремийным антигеном Т-клетки, преимущественно с фенотипом CD4⁺, синтезировали IFN- γ во всех группах иммунных мышей.

Сравнительная оценка полученных нами данных о концентрациях цитокинов в клеточном супернатанте иммунных и интактных мышей показала, что иммунизация аттенуированными штаммами *F. tularensis* приводила к синтезу IFN- γ , IL-17A и IL-10.

Наши дальнейшие исследования показали, что иммунизация аттенуированными вакцинными штаммами *F. tularensis* формирует протективный иммунитет через 30 сут после вакцинации и приводит к индукции функционально активных специфических субпопуляций T_{EM} и T_{CM} с фенотипом как CD4⁺, так и CD8⁺ Т-клеток памяти. Из полученных результатов, представленных на рисунках 4.8 и 4.9, можно сделать вывод, что субпопуляции T_{EM} клеток памяти являлись основными подмножествами Т-клеток, которые стремительно увеличивались после иммунизации. Вероятно, это связано с тем, что исследования были проведены на 30 сут после иммунизации – период, когда идёт фаза активного формирования поствакцинального иммунитета. Увеличение T_{CM} клеток памяти за счёт CD8⁺ Т-клеток позволяет сделать вывод об их необходимости для иммунной защиты посредством специфической цитотоксичности при повторной встрече с антигенами *F. tularensis*. Наличие обеих субпопуляций T_{EM} и T_{CM} клеток памяти обуславливало выживание животных через 30 сут после иммунизации.

Многопараметрическая проточная цитометрия позволяет не только детально описать фенотипические характеристики Т-клеток памяти, но и изучить их функциональную активность. Несколькими группами исследователей на мышинной модели было показано, что для формирования протективного иммунитета необходимо наличие классических Th1-цитокинов, таких как IFN- γ и TNF- α [80, 81, 96, 227, 254]. IFN- γ играет ключевую роль в формировании протективного поствакцинального иммунитета при внутриклеточных инфекциях [226]. На модели экспериментального туберкулеза было показано, что вакцинация БЦЖ (*Bacillus Calmette–Guérin*) обуславливает генерацию CD4⁺ Т-клеток, продуцирующих IFN- γ после стимуляции специфическим антигеном, обеспечивая защиту организма [150]. Однако в других работах сообщалось о том, что защита от туберкулезной инфекции, напротив, не коррелировала с синтезом IFN- γ CD4⁺ Т-клетками [66, 168, 187], что указывает на наличие IFN-независимых защитных механизмов и важность других цитокинов. Согласно литературным данным наряду с IFN- γ TNF- α обеспечивает защиту мышей при туляреминой инфекции: мыши, получавшие нейтрализующие антитела против TNF- α , быстро погибали от сублетальных доз штамма *F. tularensis* LVS как во время первичной, так и вторичной инфекции [253]. В другом исследовании на трех моделях экспериментальных внутриклеточных инфекций было показано, что синтез TNF- α CD8⁺ и CD4⁺ Т-клетками обуславливает способность Т-клеток контролировать и устранять размножение бактерий внутри макрофагов, обеспечивая защиту при повторном заражении животных [92].

В своем исследовании мы показали, что помимо IFN- γ синтез TNF- α также является важным иммунологическим параметром, отражающим протективность иммунитета, и его продуцентами являются как CD4⁺ и CD8⁺ T_{EM}, так и CD4⁺ и CD8⁺ T_{CM} клетки памяти, а также, что иммунизация всеми исследуемыми штаммами приводила к синтезу IFN- γ и TNF- α субпопуляциями T_{EM} и T_{CM} в ответ на *in vitro* стимуляцию туляреминым антигеном. Полученные нами результаты указывают на синергию IFN- γ ⁺ и TNF- α ⁺ T_{EM} и T_{CM} клеток памяти в обеспечении защиты мышей при туляремии и возможность использования этих иммунологических

показателей Т-клеток памяти в качестве критериев оценки протективного иммунитета.

Известно, что полифункциональные Т-клетки памяти, синтезирующие два и более цитокина, коррелируют с защитой, индуцированной вакциной, от хронических бактериальных и вирусных инфекций, по сравнению с Т-клетками, продуцирующими только один цитокин [33, 56, 100]. В своей работе нам не представилось возможным оценить вклад подмножеств полифункциональных Т-клеток памяти в формирование противотуляремийного иммунитета. Полученные результаты лишь позволяют предположить о наличии полифункциональных клеток, синтезирующих вышеуказанные подмножества цитокинов, на основании субпопуляций T_{EM} и T_{CM} с фенотипами $CD4^+$ и $CD8^+$, синтезирующих как $IFN-\gamma$, так и $TNF-\alpha^+$.

Сопоставляя данные по обсемененности (рисунок 4.12) и результаты иммунологических исследований можно предположить, что ослабление контроля за размножением штамма *F. tularensis* Schu в селезенках мышей, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ связано с меньшим количеством активированных $CD4^+$ и $CD8^+$ в пуле T_{EM} клеток памяти (рисунок 4.9) по сравнению с группами животных, иммунизированных модифицированными штаммами. Кроме того, анализ цитокин-продуцирующих T_{EM} и T_{CM} клеток памяти показал, что иммунизация новыми рекомбинантными штаммами *F. tularensis* 15/23-1 $\Delta recA$ и *F. tularensis* 15/23-1/*sodB* $\Delta recA$ приводит к более высокому синтезу $IFN-\gamma$ $CD8^+ T_{EM}$, $CD4^+$ и $CD8^+$ и T_{CM} , а иммунизация исходным вакцинным штаммом 15 НИИЭГ, напротив, приводит к увеличению $TNF-\alpha$ -продуцирующих $CD4^+$ и $CD8^+ T_{EM}$ клеток памяти (рисунок 4.10). Эти результаты, возможно, объясняют причины снижения реактогенности новых аттенуированных штаммов и более эффективную защиту при последующем инфицировании природным штаммом.

Наше исследование позволяет сделать вывод, что механизм формирования противотуляремийного протективного иммунитета, вероятно, связан с клетками

памяти как T_{EM} , так и T_{CM} субпопуляций $CD4^+$ и $CD8^+$ и их эффекторными функциями, опосредованными экспрессией CD69 молекулы и синтеза ими IFN- γ и TNF- α . Проведенные исследования также показывают, что В-клетки принимают активное участие в индукции и регуляции адаптивного иммунного ответа против *F. tularensis*. Помимо синтеза специфических к ЛПС *F. tularensis* антител, В-клетки инициируют иммунные реакции посредством секреции цитокина IFN- γ , а также выступают в роли АПК, о чем свидетельствует экспрессия CD69 молекулы. Таким образом, полученные данные о влиянии вакцинации живой туляреминой вакциной на генерацию и функциональную активность специфических Т- и В-клеток у мышей позволяют рассматривать их как еще один шаг в понимании механизмов формирования иммунитета при туляремии.

ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ ИММУННОГО ОТВЕТА МЫШЕЙ ЛИНИИ BALB/C В ОТДАЛЕННЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ ВАКЦИНАЦИИ АТТЕНУИРОВАННЫМИ ШТАММАМИ *F. TULARENSIS*

Известно, что для формирования защиты от заражения внутриклеточной бактерией *F. tularensis* необходима активация клеточного и гуморального иммунного ответа, однако их роль в долгосрочной защите от вирулентных штаммов *F. tularensis* (25 и более лет) недостаточно изучена [113]. Поствакцинальный протективный иммунитет связывают с наличием CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клеток памяти и специфических антител к антигенам *F. tularensis*, однако уровень клеточных реакций, отражающих защиту организма от вирулентных штаммов *F. tularensis*, до настоящего времени не установлен. Изучение механизмов, лежащих в основе формирования противотуляремийного иммунитета, и определение критериев его оценки внесет значительный вклад в разработку новых кандидатов в вакцинные штаммы против *F. tularensis* [38]. В настоящее время основная часть проводимых исследований сосредоточена на изучении иммунологических реакций, отражающих защиту мышей против вирулентных штаммов *F. tularensis* на 21-28 сут после вакцинации. Именно в этот временной интервал происходит активное формирование адаптивного иммунитета, обеспечивающего эффективную защиту [85, 157]. Тем не менее, при изучении параметров иммунного статуса при вакцинации препаратами против *F. tularensis* важно изучить их динамику после окончания активной фазы и оценить роль в обеспечении длительного протективного иммунитета.

На данном этапе задачами нашего исследования являлись выбор и оценка иммунологических параметров, отражающих протективные свойства вакцинных препаратов в отдаленные сроки после иммунизации на мышинной модели экспериментальной туляремии. Мышиная модель является наиболее рациональным выбором для первоначальных исследований из-за иммунологических инструментов, доступных для четкого определения механизмов

специфической защиты [9, 226]. Изучение адаптивного иммунитета проводили на мышах линии BALB/с, которых иммунизировали вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производными – штаммами *F. tularensis* 15/23-1 Δ recA и *F. tularensis* 15/23-1/*sodB* Δ recA, обладающих сниженной реактогенностью и генетической стабильностью, сохраняющих свою иммуногенность. Использование в работе панели вакцинных штаммов со схожими свойствами позволили повысить степень объективности результатов исследования.

В данной главе мы оценили иммунологические показатели специфического гуморального и клеточного поствакцинального противотуляремиального иммунитета в отдаленные сроки после вакцинации. Для оценки функциональной активности Т- и В-клеток была использована проточная цитофлуориметрия, оценку продукции цитокинов IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-17A и титров специфических IgG антител к ЛПС *F. tularensis* в сыворотке крови проводили методом иммуноферментного анализа на 60, 90 и 180 сут после иммунизации. Одной из задач данного этапа исследования также была оценка динамики изменения субпопуляционного состава Т-клеток памяти и их функциональной активности в зависимости от времени, прошедшего после вакцинации штаммами *F. tularensis*. Оценку протективных свойств вакцинных препаратов в вышеуказанные сроки проводили после подкожного инфицирования тест-заражающими природными штаммами *F. tularensis* Schu subsp. *tularensis* и *F. tularensis* 503 subsp. *holarctica* (рисунок 5.1).

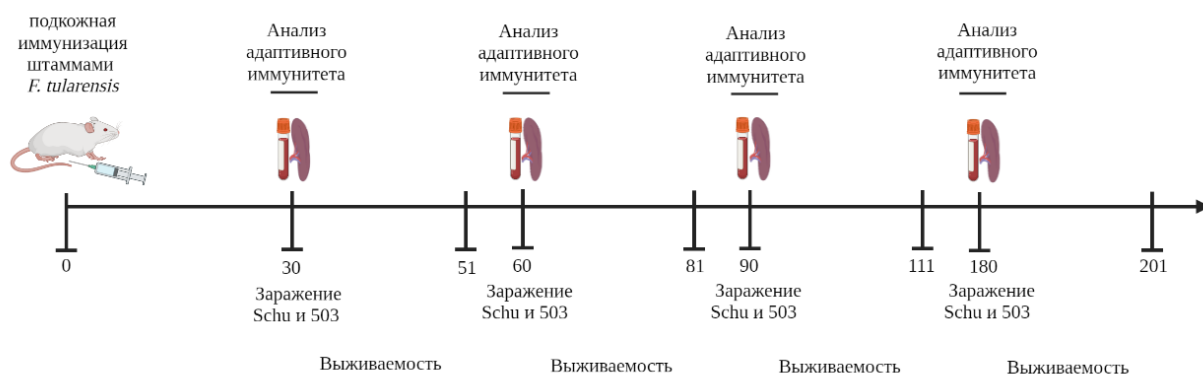


Рисунок 5.1 – Схема экспериментов к Главе 5.

5.1 Оценка протективных свойств штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производных в отдаленные сроки после вакцинации у мышей

Одной из проблем при разработке новых вакцин против туляремии является отсутствие иммунологических параметров, позволяющих дать предварительную оценку протективных свойств вакцинных препаратов [221]. На данном этапе исследования мы сравнили протективные свойства испытуемых штаммов в отдаленные сроки после вакцинации мышей линии BALB/с. Для определения протективных свойств вакцинных штаммов животным подкожно вводили тест-заражающие природные штаммы *F. tularensis* 503 и *F. tularensis* Schu в дозе 1000 DCL через 60, 90 и 180 дней после иммунизации. Дозы заражения подтверждали высевом бактериальной суспензии на плотную питательную среду FT-агар. В качестве контроля была использована группа интактных мышей. За животными наблюдали 21 день, оценивая динамику изменения веса после заражения и процент гибели животных. Результаты протективной активности исследуемых вакцинных препаратов представлены в таблице 5.1.

Таблица 5.1 – Протективные свойства вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производных в зависимости от сроков после иммунизации и тест-заражающих природных штаммов *F. tularensis*.

Заражающий штамм <i>F. tularensis</i> , подвида	Сутки после иммунизации	Иммунизирующий штамм <i>F. tularensis</i>		
		15 НИИЭГ	15/23-1 Δ recA	15/23-1/ <i>sodB</i> Δ recA
503 subsp. <i>holarctica</i>	60	100*	100	100
	90	100	100	100
	180	100	100	100
Schu subsp. <i>tularensis</i>	60	80	80	70
	90	60	70	70
	180	30	20	30

*Примечание: Результаты представлены в виде процента выживших особей от общего количества животных в группе.

Согласно приведенным данным, иммунизация всеми исследуемыми вакцинными штаммами во все сроки после вакцинации, вплоть до 180 сут, обеспечивала защиту мышей в 100 % случаев при подкожном заражении

природным штаммом *F. tularensis* 503 subsp. *holarctica*. При заражении природным штаммом другого подвида *F. tularensis* subsp. *tularensis* Schu полная защита была обеспечена только в случае, когда после иммунизации прошло 30 сут (Глава 4), дальнейшее увеличение времени после вакцинации до 60 – 90 сут перед заражением приводило к выраженному снижению эффективности защиты до 60 – 80% (в зависимости от иммунизирующего штамма) и до 20-30 % на 180 сут после иммунизации. Различия в проценте выживших животных среди иммунизированных групп были незначительными во все сроки после иммунизации. Полученные результаты свидетельствуют, что все изучаемые вакцинные штаммы наиболее эффективно защищают мышей от природного штамма *F. tularensis* 503 subsp. *holarctica*, менее эффективно – от штамма *F. tularensis* Schu subsp. *tularensis*.

Одним из показателей физиологического состояния организма лабораторных животных при инфекционном процессе является изменение их веса [266]. Взвешивание мышей проводили в течение 23 сут после заражения природными штаммами. Сравнительный анализ динамики веса показал, что, несмотря на отсутствие погибших животных во всех иммунных группах, при заражении штаммом *F. tularensis* 503 subsp. *holarctica*, мыши теряли в весе: наибольшее снижение веса (до 17 %) наблюдалось на 5-7 сут в группе животных, зараженных в самый отдаленный срок (180 сут) после вакцинации штаммом *F. tularensis* 15/23-1/*sodBΔrecA* (рисунок 5.2).

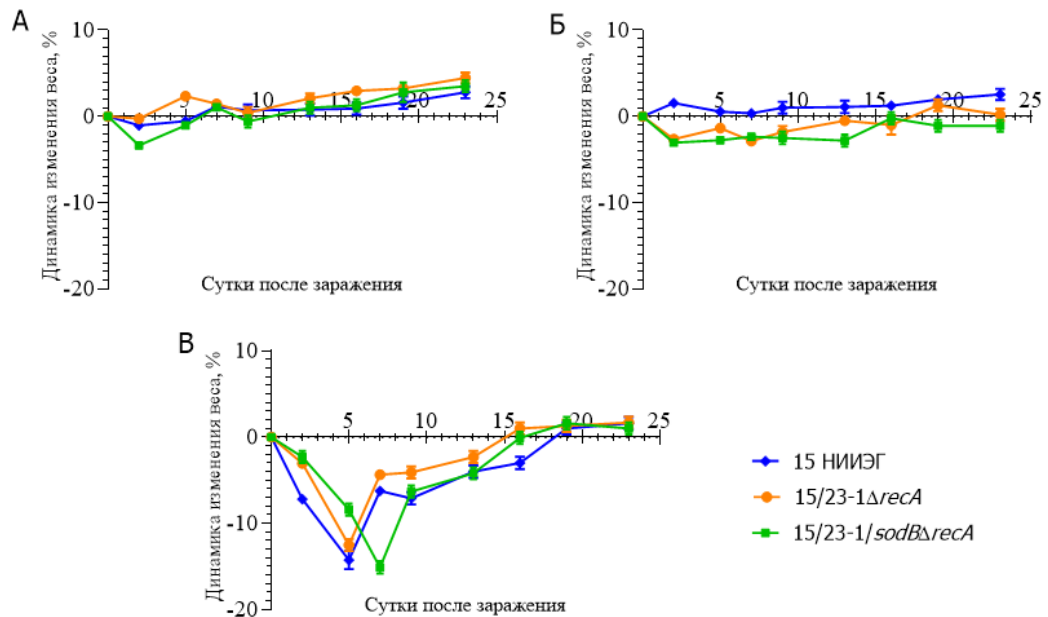


Рисунок 5.2 – Динамика изменения веса мышей линии BALB/c после подкожного заражения природным штаммом *F. tularensis* 503 в дозе 1000 DCL в отдаленные сроки после иммунизации аттенуированными штаммами *F. tularensis*.
Примечание: А – 60 сут; Б – 90 сут; В – 180 сут.

Иная картина течения инфекционного процесса наблюдалась в группах иммунных мышей, зараженных природным штаммом *F. tularensis* Schu subsp. *tularensis* (рисунок 5.3).

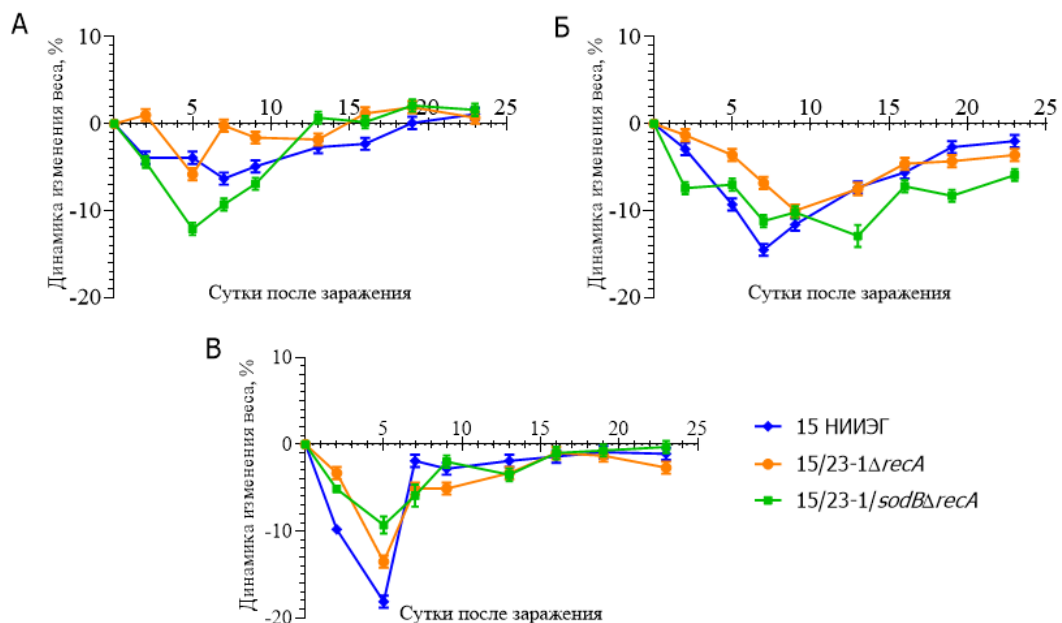


Рисунок 5.3 – Динамика изменения веса мышей линии BALB/c после подкожного заражения природным штаммом *F. tularensis* Schu в дозе 1000 DCL в отдаленные сроки после иммунизации аттенуированными штаммами *F. tularensis*.
Примечание: А – 60 сут; Б – 90 сут; В – 180 сут.

На 60 и 90 сутки после иммунизации заражение природным штаммом *F. tularensis* Schu subsp. *tularensis* во всех иммунных группах приводило к гибели 20-40 % животных. Изучение динамики изменения веса после заражения не выявило значительных различий между всеми группами иммунизированных животных: заражение вызывало максимальное снижение веса в диапазоне 12-15 %, которое наблюдалось вплоть до 15-25 сут, и только к концу срока наблюдений вес начинал нарастать (рисунок 5.3 А и 5.3 Б). При этом в группах животных, зараженных на 90 сут после иммунизации, отмечалось более медленное нарастание веса, который так и не достигал исходных значений до конца срока наблюдений, что отражает более тяжелое течение инфекционного процесса.

Заражение природным штаммом *F. tularensis* Schu на 180 сут после иммунизации приводило к наибольшей смертности во всех группах мышей, вакцинированных исследуемыми штаммами. Сравнительный анализ динамики изменения веса показал, что во всех группах наблюдалось падение веса животных, которое было максимальным на 5 сут после заражения и достигало 9-18 % (рисунок 5.3 С). Эти данные коррелируют с резким снижением выживаемости животных к 180 сут после иммунизации и свидетельствуют о тяжелом течении инфекции, следует отметить, что такие сроки гибели животных характерны при туляремии и для не вакцинированных животных.

Анализ динамики изменения веса мышей после заражения природными штаммами в разные сроки после иммунизации позволил выявить некоторые закономерности, характеризующие постиммунные процессы в организме. Полученные данные согласуются с результатами предыдущих исследований [9, 38], подтверждая, что оценка динамики изменения веса отражает тяжесть инфекционного процесса и может быть использована в качестве дополнительного параметра косвенной оценки протективных свойств изучаемых вакцинных препаратов.

5.2 Оценка изменения титров специфических антител в сыворотке крови мышей в отдаленные сроки после иммунизации штаммами *F. tularensis*

Специфические антитела к ЛПС *F. tularensis* рассматривают в качестве критерия оценки напряженности противотуляремийного иммунитета как для людей (постинфекционный и вакцинный), так и при моделировании туляремийной инфекции на лабораторных животных [4]. Анализ гуморального иммунного ответа проводили методом ИФА, оценивая уровень специфических к ЛПС *F. tularensis* антител в сыворотке крови на 60, 90 и 180 сут после вакцинации. В качестве отрицательного контроля была использована сыворотка интактных мышей. Результаты исследований представлены в таблице 5.2.

Таблица 5.2 – Титры специфических IgG антител к ЛПС *F. tularensis* в сыворотке крови мышей линии BALB/c в разные сроки после иммунизации.

Срок после иммунизации (сут)	Иммунизирующий штамм <i>F. tularensis</i>		
	15 НИИЭГ	15/23-1 Δ recA	15/23-1/sodB Δ recA
60	1:200 (1:200; 1:400)	1:200 (1:100; 1:400)	1:400 (1:200; 1:400)
90	1:400 (1:200; 1:800)	1:400 (1:200; 1:800)	1:400 (1:400; 1:800)
180	1:200 (1:200; 1:800)	1:200 (1:200; 1:800)	1:400 (1:200; 1:800)
Контроль	< 1:50	< 1:50	< 1:50

Примечание: результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха группы.

Иммунизация всеми испытуемыми штаммами индуцировала синтез IgG антител к ЛПС *F. tularensis* на протяжении всего периода наблюдения за животными. Сравнительный анализ результатов показал, что на 60 сут наибольший титр антител IgG, специфических к ЛПС *F. tularensis* мы наблюдали в группе животных, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15/23-1/sodB Δ recA, в группах мышей, иммунизированных штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *F. tularensis* 15/23-1 Δ recA, медианы титров антител не различались и составляли 1:200. Медианы титров IgG антител через 90 сут после вакцинации во всех группах иммунных животных составляли 1:400. На 180 сут после вакцинации штаммами

F. tularensis 15 НИИЭГ и *F. tularensis* 15/23-1 Δ recA медианы титров IgG антител составляли 1:200, в группе мышей, иммунизированных штаммом 15/23-1/sodB Δ recA – 1:400. В сыворотке крови мышей контрольной группы (интактные мыши) IgG антитела, специфичные к ЛПС *F. tularensis* не превышали пороговых значений.

Таким образом, специфические антитела к ЛПС *F. tularensis* обнаруживались до 180 сут после наблюдения во всех иммунных группах животных. Однако, согласно литературным данным, наличие только специфических антител к антигенам *F. tularensis* недостаточно для защиты от природных штаммов *F. tularensis* [260], поэтому оценка иммунологической эффективности новых вакцинных препаратов должна быть сосредоточена на понимании механизмов формирования клеточного иммунитета.

5.3 Оценка изменений субпопуляционного состава лимфоцитов в отдаленные сроки после иммунизации мышей штаммами *F. tularensis*

Клеточный иммунитет является основным звеном специфического протективного иммунитета против туляремии. Многочисленные исследования показывают, что формирование протективного иммунитета обеспечивается как CD4⁺, так и CD8⁺ Т-клетки [91, 131, 279]. Кроме того, было показано, что В-клетки играя важную роль в формировании гуморального противотуляремийного иммунитета участвуя в синтезе антител, являются важным звеном в индукции клеточного иммунитета, выступая в качестве антиген-презентирующих клеток и/или продуцентов цитокинов [226].

На следующем этапе изучения вакцинных препаратов был проведен сравнительный анализ параметров клеточного звена иммунитета. Одним из параметров оценки функциональной активности лимфоцитов является определение уровня экспрессии CD69 молекулы на поверхности Т- и В-клеток. CD69 – мембранная молекула, которая временно экспрессируется на активированных лимфоцитах [203]. В наших экспериментах мы оценивали

функциональную активность лимфоцитов в ответ на стимуляцию *in vitro* туляреминым антигеном КНК *F. tularensis* по экспрессии маркера активации CD69 различными популяциями лимфоцитов. На рисунке 5.4 приведены результаты сравнения содержания субпопуляций активированных В-клеток ($CD19^+CD69^+$), Т-хелперов ($CD3^+CD4^+CD69^+$) и цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD3^+CD8^+CD69^+$) после стимуляции *in vitro* КНК *F. tularensis* у иммунных и интактных животных в разные сроки после иммунизации.

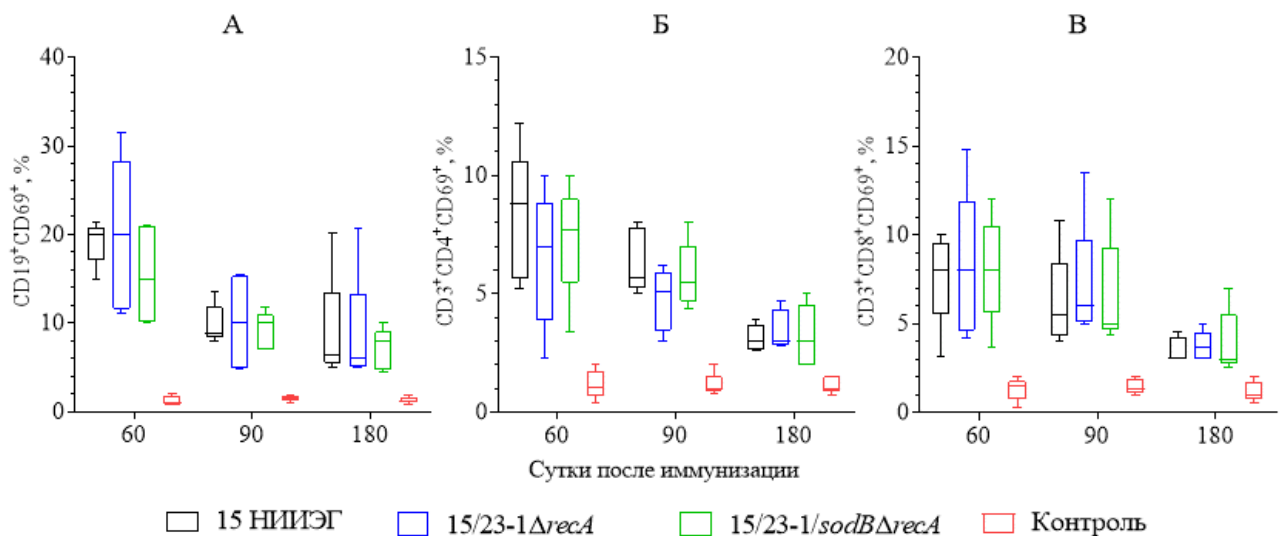


Рисунок 5.4 – Антиген-индуцированное изменение доли лимфоцитов, несущих маркер ранней активации CD69, у иммунных и интактных мышей линии BALB/c в отдаленные сроки после иммунизации вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производными.

Во всех группах иммунизированных животных мы наблюдали активацию В-лимфоцитов, о чем свидетельствовало увеличение уровня экспрессии CD69 молекулы на их поверхности при стимуляции КНК *F. tularensis* по сравнению с контрольной группой животных (рисунок 5.4 А). Следует отметить, что при увеличении срока после иммунизации наблюдалось снижение относительного содержания В-клеток с фенотипом $CD19^+CD69^+$, но даже на 180 сут после вакцинации В-лимфоциты были способны активироваться в ответ на стимуляцию антигеном *F. tularensis*.

Сравнительный анализ уровня экспрессии CD69 молекулы на поверхности субпопуляций Т-лимфоцитов показал, что под влиянием КНК *in vitro*

статистически значимо ($p < 0,05$) возрастало относительное содержание Т-хелперов с фенотипом $CD3^+CD4^+CD69^+$ у всех иммунных мышей, которое снижалось с увеличением срока после иммунизации (рисунок 5.4Б). Экспрессия CD69 молекулы на поверхности Т-хелперов имела место вплоть до 180 сут после иммунизации у всех иммунных животных. Достоверных отличий в уровнях экспрессии CD69 молекулы на поверхности Т-хелперов между группами иммунизированных животных выявлено не было.

Ещё одной важнейшей субпопуляцией Т-клеток является субпопуляция цитотоксических Т-лимфоцитов. При анализе уровня экспрессии CD69 молекулы на поверхности $CD8^+$ Т-лимфоцитов мы наблюдали статистически значимое увеличение активированных лимфоцитов с фенотипом $CD3^+CD8^+CD69^+$ во всех группах иммунизированных животных в ответ на стимуляцию КНК *F. tularensis* по сравнению с контрольной группой.

Таким образом, нами было показано, что в организме иммунных мышей Т- и В-лимфоциты сохраняют маркер ранней активации CD69 после стимуляции их туляремиальным антигеном *in vitro* вплоть до самых отдаленных сроков (180 сут) наблюдений.

5.4 Оценка изменения уровней цитокинов в клеточном супернатанте лимфоцитов в отдаленные сроки после иммунизации мышей линии BALB/с штаммами *F. tularensis*

Другим параметром, отражающим функциональную активность лимфоцитов, является оценка уровня секретируемых ими цитокинов. Поэтому на следующем этапе исследования мы провели анализ уровня ключевых цитокинов при туляремиальной инфекции, таких как IFN- γ , IL-17A, IL-10 и IL-4, при стимуляции клеток *in vitro* антигеном КНК *F. tularensis*. Результаты представлены на рисунке 5.5.

Во всех группах иммунизированных животных мы наблюдали значительное повышение уровня IFN- γ во все исследуемые сроки после вакцинации. Следует

также отметить, что с увеличением срока после иммунизации вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производными штаммами *F. tularensis* 15/23-1 Δ recA и *F. tularensis* 15/23-1/*sodB* Δ recA, наблюдалось снижение продукции IFN- γ клетками в ответ на стимуляцию *in vitro* КНК. Тем не менее, даже на 180 сут после иммунизации в группах иммунных животных мы отмечаем достоверное увеличение уровня IFN- γ (в 6 – 8,75 раз) в сравнении с интактной группой.

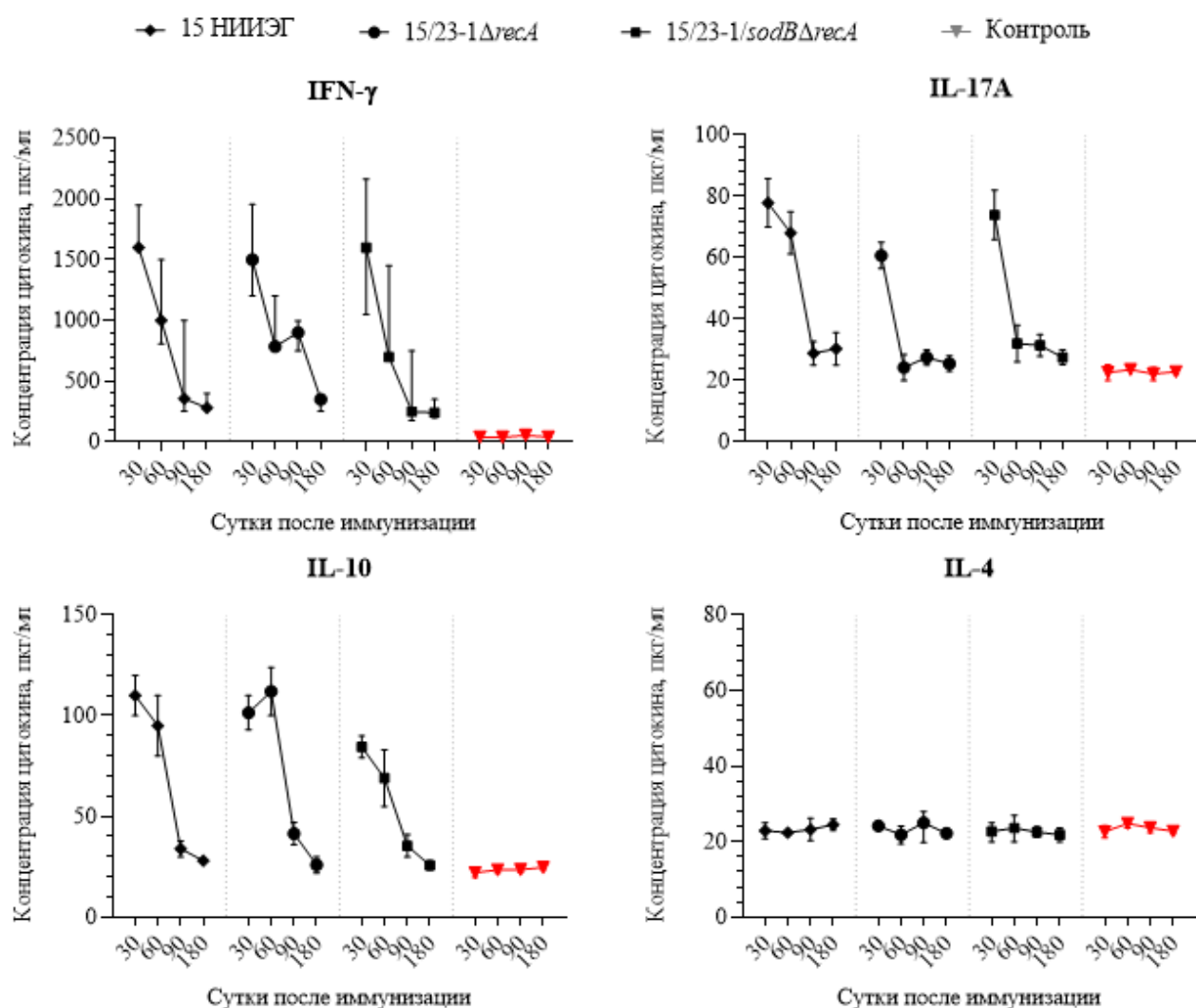


Рисунок 5.5 – Уровни цитокинов в клеточном супернатанте лимфоцитов у иммунных и интактных мышей линии BALB/c в разные сроки после иммунизации вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производными.

Сравнительный анализ уровня IL-17A показал, что на 60 сут после вакцинации имело место увеличение в 2,8 раза синтеза цитокина только в группе мышей, иммунизированных вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ. На

60 сут мы наблюдали антиген-индуцированное повышение (в 2,6 – 4,9 раз) уровня IL-10 всех группах иммунизированных животных. Уровень секреции IL-4 не изменялся в группах иммунных животных под влиянием антигена в исследуемые сроки после иммунизации и был сопоставим с интактной группой.

Многими исследователями на мышинной модели была продемонстрирована значимая роль IFN- γ для формирования иммунитета к *F. tularensis* [82, 96, 114, 227, 254]. IFN- γ способен усиливать иммунный ответ посредством таких механизмов, как активация макрофагов, развитие иммунного ответа по Th1 пути, переключение изотипа В-клеток на IgG2a и контроль над репликацией *F. tularensis* [262]. Полученные нами результаты показывают, что уровень продукции этого цитокина лимфоцитами иммунизированных мышей в ответ на стимуляцию КНК достоверно превышает этот показатель у интактных мышей до 180 сут после иммунизации.

Согласно литературным данным, в формировании протективного противотуляремиального иммунитета наряду с IFN- γ значимую роль играет IL-17A, секретируемый CD4⁺, CD8⁺ и CD4⁺CD8⁺ субпопуляциями Т-клеток, и способствующий элиминации бактерий *F. tularensis* [94]. В исследовании, основанном на *in vitro* модели совместного культивирования инфицированных макрофагов и спленоцитов мышей, иммунизированных подкожно штаммом *F. tularensis* LVS или рекомбинантным штаммом на основе *F. tularensis* Schu S4, уровни IFN- γ и IL-17A коррелировали с контролем внутримакрофагальной инфекции, вызванной вирулентным штаммом *F. tularensis* Schu S4 [129]. С другой стороны, тремя независимыми группами исследователей было показано, что IL-17A секретируется преимущественно после интраназальной иммунизации штаммом *F. tularensis* LVS, и отсутствует, когда животные иммунизированы подкожно или внутрикожно [94, 172, 193, 279]. В нашей работе мы наблюдали увеличение уровня продукции IL-17A клетками иммунных животных только в группе мышей, иммунизированных исходным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, на 60 сут после подкожной иммунизации.

В исследованиях на мышах показано, что IL-4 не столь важен в иммунном ответе при интрадермальном и интраназальном заражении штаммами *F. tularensis*

[152, 172]. В то же время как нокаутные мыши по IL-10 становились очень чувствительны к туляреминой инфекции [200].

Таким образом, наличие в клеточном супернатанте таких цитокинов как IFN- γ и IL-10, вероятно, указывает на смешанный иммунный ответ по Th1/Th2 пути.

5.5 Сравнительный анализ изменение функциональной активности субпопуляций Т-клеток памяти у мышей линии BALB/с в отдаленные сроки после вакцинации штаммами *F. tularensis*

На данном этапе работы по мере увеличения времени с момента иммунизации мы оценивали фенотип и функциональную активность CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток памяти, определяющих долгосрочный эффект иммунизации. Через 60 и 90 сут после иммунизации в экспериментах *in vitro* мы оценивали динамику изменения субпопуляционного состава антигенспецифических T_{ЕМ} и T_{СМ} в пуле CD4⁺ и CD8⁺, их функциональную активность по уровню экспрессии раннего маркера активации CD69 и продукцию цитокинов IFN- γ и TNF- α . В качестве специфического индуктора для стимуляции клеток *in vitro* использовали КНК *F. tularensis*.

5.5.1 Анализ субпопуляционного состава Т-клеток памяти

Имунофенотипирование основных субпопуляций Т-клеток памяти селезенки мышей проводили с помощью флуоресцентно-меченных моноклональных антител к поверхностным антигенам CD4, CD8, CD44 и CD62L. Данная панель CD-маркеров позволяет идентифицировать T_{ЕМ} (CD44⁺CD62L⁻) и T_{СМ} (CD44⁺CD62L⁺) в пуле CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов. Для оценки антигенреактивности субпопуляций Т-клеток памяти анализировали уровень экспрессии маркера активации лимфоцитов CD69. На рисунке 5.6 представлена динамика изменения субпопуляционного состава Т-клеток памяти в зависимости от времени, прошедшего после вакцинации.

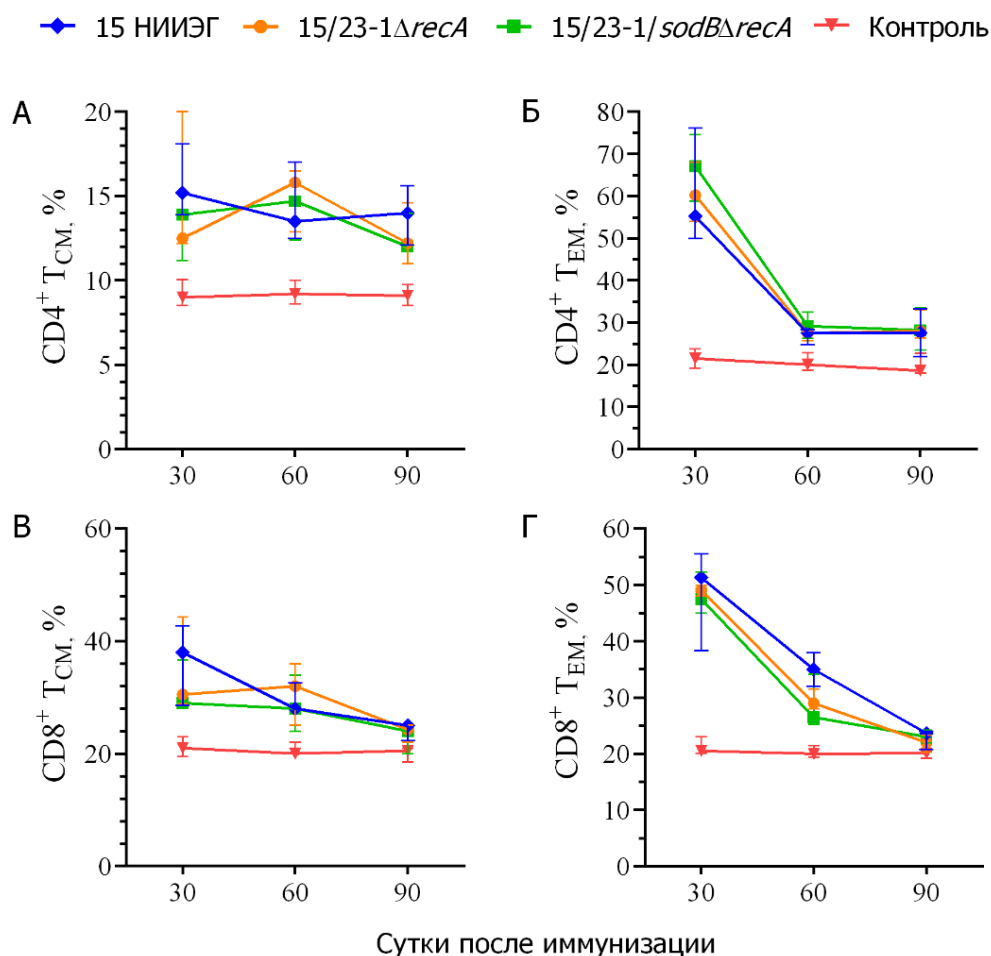


Рисунок 5.6 – Динамика изменения субпопуляционного состава Т-клеток памяти в селезенке мышей линии BALB/с, в зависимости от времени, прошедшего после вакцинации аттенуированными штаммами *F. tularensis*.

Примечания: А – $CD4^+ T_{CM}$; Б – $CD4^+ T_{EM}$; В – $CD8^+ T_{CM}$; Г – $CD8^+ T_{EM}$.

По данным цитометрического анализа установлено достоверное антиген-индуцированное увеличение субпопуляций Т-клеток памяти во всех группах иммунизированных мышей как в эффекторную фазу иммунного ответа (30 сут), так и в отдаленные поствакцинальные сроки (60 и 90 сут) по сравнению с показателями в группе контроля ($p < 0,05$). Достоверных различий в показателях между иммунными группами во все сроки исследования выявлено не было. С увеличением поствакцинального срока с 60 до 90 сут отмечено отсутствие достоверных изменений в процентном содержании $CD4^+ T_{CM}$ (рисунок 5.6 А) и $CD4^+ T_{EM}$ (рисунок 5.6 Б), и, напротив, снижение $CD8^+ T_{CM}$ (рисунок 5.6 В) и $CD8^+ T_{EM}$ (рисунок 5.6 Г) во всех группах иммунизированных мышей.

Анализ уровня экспрессии маркера ранней активации CD69 широко применяется для изучения эффекторной функции лимфоцитов [203, 271]. На рисунке 5.7 представлена динамика изменения процента активированных клеток T_{EM} и T_{CM} в пуле $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток. В качестве специфического индуктора в условиях *in vitro* был использован туляреминый антиген.

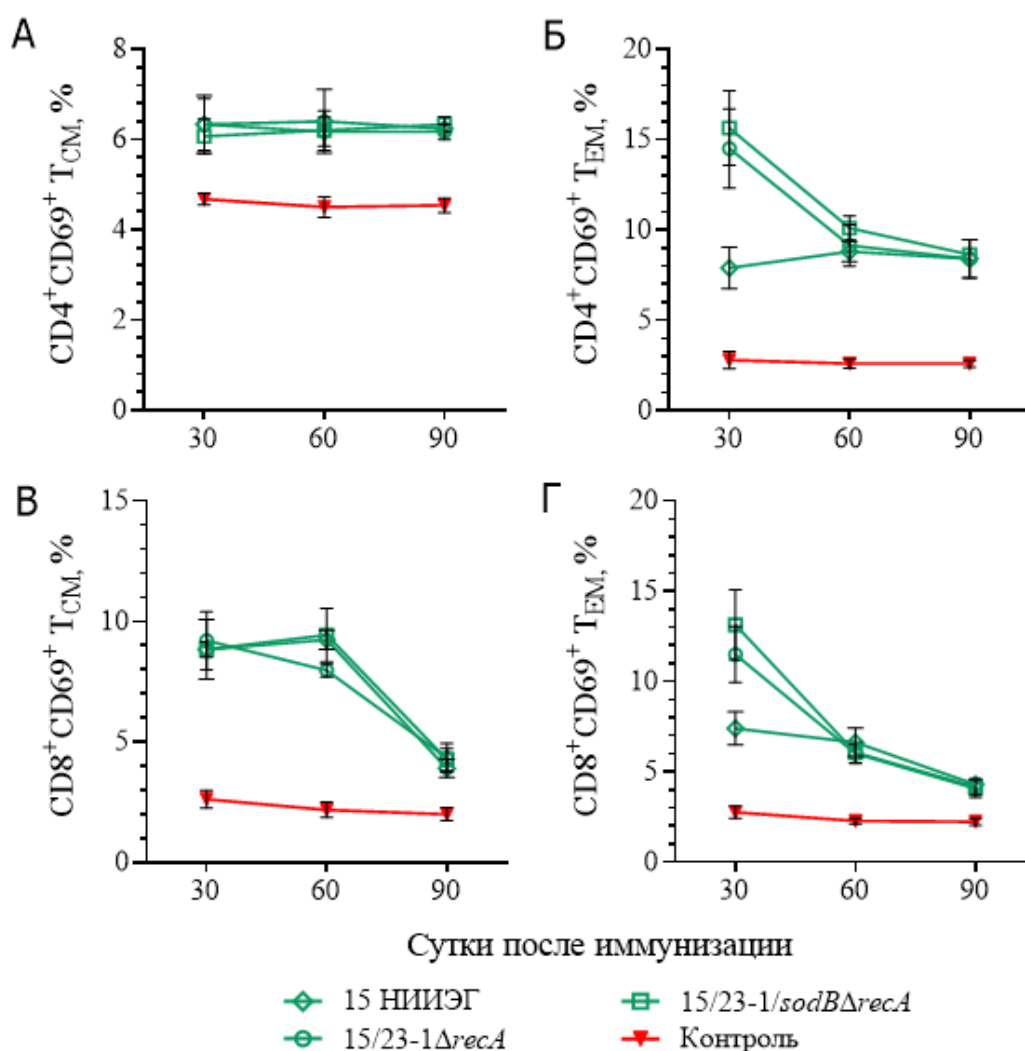


Рисунок 5.7 – Доля активированных T_{CM} и T_{EM} в пуле $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток в селезенке мышей линии BALB/c, в зависимости от времени, прошедшего после вакцинации аттенуированными штаммами *F. tularensis*.

Примечания: А – $CD4^+ T_{CM}$; Б – $CD4^+ T_{EM}$; В – $CD8^+ T_{CM}$; Г – $CD8^+ T_{EM}$.

Анализ уровня экспрессии CD69 молекулы на поверхности $CD4^+$ Т-клеток памяти показал, что во все сроки исследования – 30, 60 и 90 сут после иммунизации наблюдалось антиген-индуцированное увеличение процентного содержания субпопуляции $CD4^+ T_{CM}$ (рисунок 5.7 А) по сравнению с показателями в группе

контроля ($p < 0,05$), однако статистически значимых различий между группами иммунных животных и поствакцинальными сроками выявлено не было. На 30 сут после иммунизации аттенуированными штаммами *F. tularensis* мы наблюдали статистически значимое повышение уровня экспрессии CD69 молекулы на поверхности CD4⁺ T_{EM} (рисунок 5.7 Б): после вакцинации *F. tularensis* 15 НИИЭГ – 7,7 % (6,0; 10,0), *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* – 15,2 % (10,4; 17,9), *F. tularensis* 15/23-1/*sodB*Δ*recA* – 14,9 % (12,5; 19,5), контроль – 3,0 % (1,75; 3,75). Через 60 сут наблюдалось снижение процентного содержания CD69⁺ T_{EM} в пуле CD4⁺ относительно предыдущего срока исследования, составив после вакцинации *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* – 8,0 % (8,0; 11,4), *F. tularensis* 15/23-1/*sodB*Δ*recA* – 10,0 % (9,0; 11,3). В группе мышей, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, на 60 сут процентное содержание CD69⁺CD4⁺ T_{EM} клеток составило 8,5 % (8,0; 9,9). При увеличении поствакцинального срока до 90 сут не наблюдалось статистически значимых различий ($p > 0,05$) в процентном содержании активированных CD4⁺ T_{EM} в сравнении с аналогичными данными каждой иммунной группы на 60 сут.

У мышей через 30 сут после вакцинации аттенуированными штаммами *F. tularensis* наблюдалось антиген-индуцированное повышение количества активированных CD8⁺ T_{CM} (рисунок 5.7 В): после вакцинации *F. tularensis* 15 НИИЭГ – 7,7 % (7,5; 11,3), *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* – 8,2 % (7,8; 11,6), *F. tularensis* 15/23-1/*sodB*Δ*recA* – 8,8 % (8,3; 9,4), контроль – 3,0 % (1,9; 3,15). Через 60 сут после иммунизации всеми аттенуированными штаммами достоверных изменений в количестве активированных CD8⁺ T_{CM} зарегистрировано не было. На 90 сут во всех группах иммунных животных наблюдалось резкое снижение данной субпопуляции Т-клеток памяти относительно предыдущих сроков исследования, при этом в сравнении с показателем контрольной группы оставалось выше.

С увеличением срока после иммунизации в группах животных, вакцинированных рекомбинантными штаммами *F. tularensis*, наблюдается снижение процентного содержания активированных CD8⁺ T_{EM} (рисунок 5.7 Г). В группе мышей, иммунизированных штаммом 15 НИИЭГ, на 30 и 60 сут после

вакцинации достоверных различий $CD8^+ T_{EM}$ зарегистрировано не было, однако на 90 сут также наблюдалось их снижение.

Таким образом, сравнительный анализ субпопуляций $CD69^+$ Т-клеток памяти в отдаленные поствакцинальные сроки показал, что с увеличением периода после иммунизации исследуемыми аттенуированными штаммами *F. tularensis* наблюдается снижение активированных T_{CM} и T_{EM} в пуле $CD8^+$ Т-клеток и отсутствие статистически значимых различий в процентном содержании активированных T_{CM} и T_{EM} в пуле $CD4^+$ Т-клеток на 60 и 90 сут.

5.5.2 Анализ цитокин-продуцирующей активности Т-клеток памяти

Другим параметром функциональной активности Т-клеток памяти является оценка продукции цитокинов. На этом этапе исследования анализировали уровень продукции $IFN-\gamma$ и $TNF-\alpha$ в популяциях антигенспецифических $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток памяти в отдаленные поствакцинальные сроки, которые играют ключевую роль в формировании протективного иммунитета против *F. tularensis*.

Данные, представленные на рисунке 5.8 А позволяют заключить, в ответ на иммунизацию штаммом 15 НИИЭГ и его производными установлено достоверное антиген-индуцированное повышение $IFN\gamma$ -продуцирующих $CD4^+$ T_{CM} по сравнению с показателями в группе контроля ($p < 0,05$), однако медианные значения групп иммунных животных достоверно не различались во все периоды наблюдения.

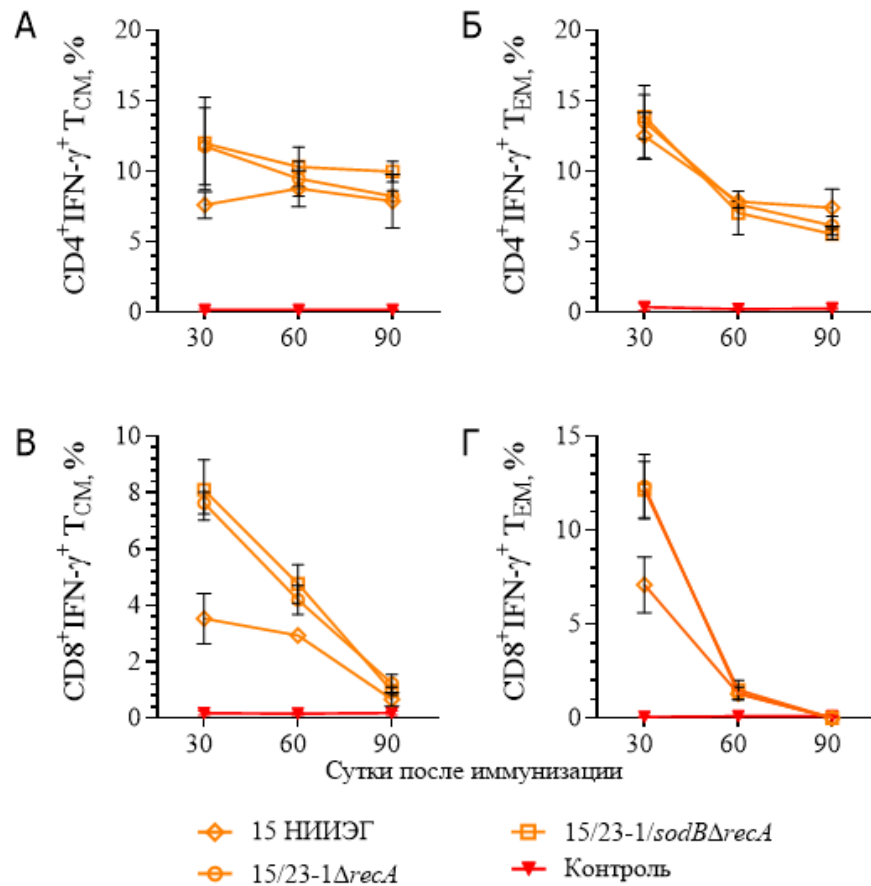


Рисунок 5.8 – Доля IFN γ -продуцирующих T_{CM} и T_{EM} в пуле CD4⁺ и CD8⁺ T-клеток в селезенке мышей линии BALB/c, в зависимости от времени, прошедшего после вакцинации аттенуированными штаммами *F. tularensis*.

Примечания: А – CD4⁺ T_{CM}; Б – CD4⁺ T_{EM}; В – CD8⁺ T_{CM}; Г – CD8⁺ T_{EM}.

После окончания эффекторной фазы иммунного ответа (30 сут) в ответ на иммунизацию аттенуированными штаммами *F. tularensis* наблюдалось снижение процентного содержания субпопуляции CD4⁺IFN- γ ⁺ T_{EM}, однако в отдаленные поствакцинальные сроки статистически значимых различий в полученных данных на 60 и 90 сут выявлено не было (рисунок 5.8 Б). Дальнейший сравнительный анализ цитометрических данных показал, что с увеличением срока с момента вакцинации наблюдается снижение субпопуляций CD8⁺ T_{CM} и CD8⁺ T_{EM}, синтезирующих IFN- γ . В частности (рисунок 5.8 В), в отдаленные сроки с увеличением времени (с 60 до 90 сут), прошедшего после иммунизации исследуемыми штаммами *F. tularensis*, процентное содержание IFN γ -продуцирующих CD8⁺ T_{CM} во всех группах иммунизированных животных снижалось: после вакцинации *F. tularensis* 15 НИИЭГ – с 3,1 % (2,5; 3,2) до 0,8%

(0,6; 1,1), *F. tularensis* 15/23-1 Δ recA – с 3,9 % (3,5; 5,2) до 1,2 % (0,7; 1,8), *F. tularensis* 15/23-1/*sodB* Δ recA – с 4,4 % (3,8; 6,1) до 1,0 % (0,7; 1,2). Аналогичную тенденцию мы наблюдали при сравнительном анализе IFN γ -продуцирующих CD8⁺ T_{ЕМ} (рисунок 5.8 Г) в группах иммунных животных: после вакцинации *F. tularensis* 15 НИИЭГ – 1,2 % (1,0; 1,7) до 0,1 % (0; 0,1), *F. tularensis* 15/23-1 Δ recA – с 1,1 % (0,9; 2,0) до 0,1 % (0; 0,1), *F. tularensis* 15/23-1/*sodB* Δ recA – с 1,2 % (0,8; 2,5) до 0,1 % (0,1; 0,1).

Согласно полученным данным, представленным на рис. 5.9 А и 5.9 Б, с увеличением срока после иммунизации наблюдается снижение TNF- α ⁺ T_{СМ} и T_{ЕМ} клеток в пуле CD4, однако статистически значимых различий в отдаленные поствакцинальные сроки (на 60 и 90 сут) выявлено не было.

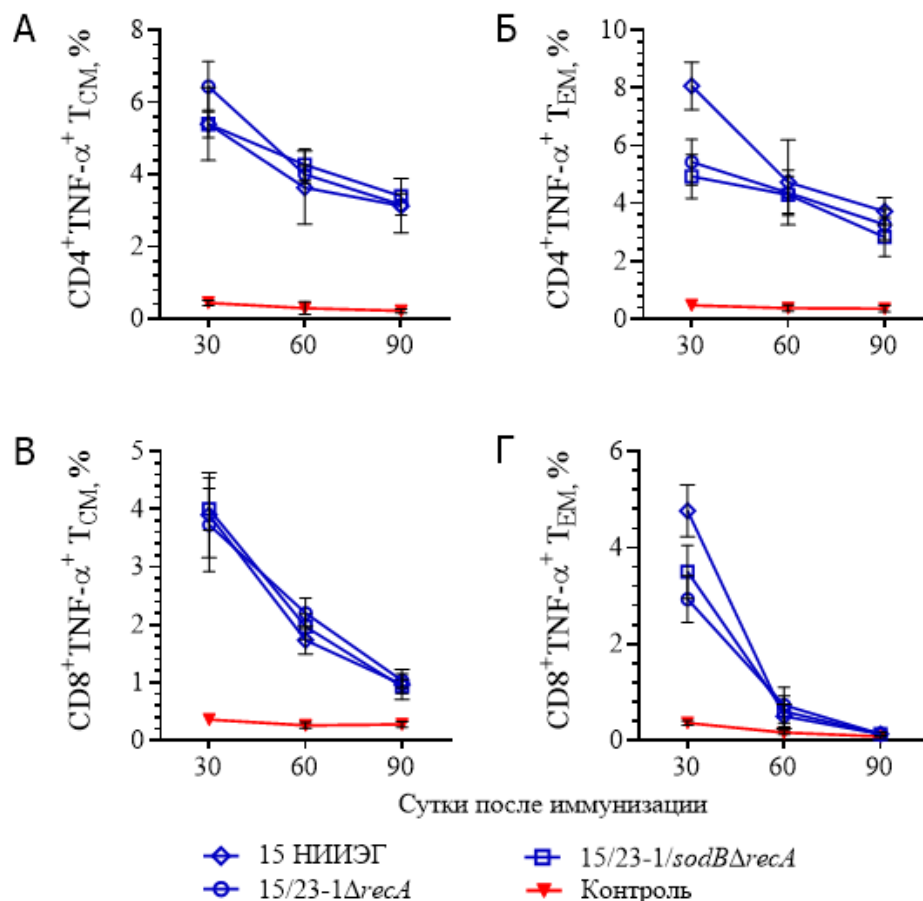


Рисунок 5.9 – Доля TNF α -продуцирующих T_{СМ} и T_{ЕМ} в пуле CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток в селезенке мышей линии BALB/с, в зависимости от времени, прошедшего после вакцинации аттенуированными штаммами *F. tularensis*.

Примечания: А – CD4⁺ T_{СМ}; Б – CD4⁺ T_{ЕМ}; В – CD8⁺ T_{СМ}; Г – CD8⁺ T_{ЕМ}.

Аналогичную тенденцию к снижению уровня цитокин-продуцирующей активности мы наблюдали при анализе $CD8^+$ Т-клеток памяти, продуцирующих TNF- α . Во всех группах иммунных животных с увеличением поствакцинального срока наблюдалось снижение $CD8^+$ Т_{СМ} (рисунок 5.9 В). Согласно данным об уровне синтеза IFN- γ и TNF- α (рисунки 5.8 Г и 5.9 Г), на 60 сут после иммунизации исследуемыми штаммами цитокин-продуцирующая активность субпопуляции $CD8^+$ Т_{ЕМ} имела слабовыраженный характер, на 90 сут не было обнаружено статистически значимых различий по числу $CD8^+$ Т_{ЕМ} (IFN- γ^+ и TNF- α^+) клеток как между группами иммунизированных мышей, так и в сравнении с интактной группой.

5.6 Заключение по Главе 5

Установлено, что иммунизация вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производными *F. tularensis* 15/23-1 Δ recA и *F. tularensis* 15/23-1/sodB Δ recA приводит к формированию долгосрочной гомологичной защиты у мышей, о чем свидетельствует отсутствие летальности в течение 180 сут после вакцинации при заражении природным штаммом *F. tularensis* 503 subsp. *holartica*. Однако, при последующем заражении иммунизированных мышей гетерологичным природным штаммом *F. tularensis* Schu subsp. *tularensis* уровень протекции зависит от срока, прошедшего после вакцинации, и снижается с увеличением поствакцинального периода.

Основной задачей данного этапа исследования было выявление иммунологических параметров, характеризующих эффективность защиты от экспериментальной туляремии в отдаленные сроки после иммунизации.

Оценку гуморального звена иммунитета проводили методом ИФА, анализируя наличие специфических к ЛПС *F. tularensis* IgG антител в сыворотках иммунных и интактных мышей. Клеточное звено иммунитета оценивали по способности лимфоцитов активироваться (экспрессировать на своей поверхности

CD69 молекулу – маркер ранней активации) и синтезировать цитокины при их стимуляции *in vitro* туляреминым антигеном.

Иммунизация всеми испытуемыми штаммами индуцировала синтез IgG антител к ЛПС *F. tularensis* в диапазоне значений 1:200-1:800 во все исследуемые сроки после иммунизации. Достоверных отличий ни по срокам отбора сывороток после иммунизации, ни между группами мышей, иммунизированных различными вакцинными штаммами выявлено не было. В сыворотках крови мышей контрольной группы IgG антитела, специфичные к ЛПС *F. tularensis*, не превышали пороговых значений. Из литературных данных известно, что специфические антитела к антигенам *F. tularensis* являются не только индикатором предшествующего вакцинального или инфекционного процесса, но и играют определенную роль в защите от повторного заражения, участвуя в опсонизации бактерий *F. tularensis* [226]. В другом исследовании было показано, что вирулентные штаммы *F. tularensis* subsp. *tularensis*, в частности, штамм *F. tularensis* Schu, способны связывать плазмин – сериновую протеазу, которая обуславливает деградацию антител и приводит к ингибированию процесса опсонизации и снижению эффективности процесса фагоцитоза бактерий [95]. Поэтому при оценке иммунологической эффективности разрабатываемых новых туляреминых вакцинных препаратов на мышинной модели экспериментальной туляремии основное внимание следует акцентировать на изучении параметров и механизмов формирования клеточного иммунитета.

Важную роль в обеспечении иммунного ответа против внутриклеточных инфекций играют полифункциональные Т-клетки, одновременно продуцирующие два и более цитокина в различных комбинациях [100]. В исследовании на мышах было показано, что именно полифункциональные Т-клетки служат источником для формирования долгоживущих клеток памяти, обеспечивающих длительность иммунитета [179]. При вторичном иммунном ответе на тот же антиген эффекторные Т-хелперы памяти обеспечивают немедленную защиту, продуцируя тот спектр цитокинов, который закрепился в результате первичного ответа [130]. Li et. al. в своих исследованиях выявили, что *M. tuberculosis*-специфические

CD4⁺CD69⁺ являются полифункциональными Т-клетками (одновременно продуцирующими IFN- γ , IL-2 и TNF- α) [175], а CD8⁺ Т-лимфоциты, экспрессирующие на своей поверхности CD69 молекулу в ответ на стимуляцию антигенами *M. tuberculosis*, являлись эффекторными Т-клетками памяти, обладающими потенциальной цитотоксической функцией. Авторы считают, что синтез IFN- γ и TNF- α CD8⁺CD69⁺ Т-клетками свидетельствует о специфичности противотуберкулезного иммунного ответа и рекомендуют использовать CD69 в качестве маркера для МТВ-специфичных CD8⁺ Т-клеток, позволяющего оценить количество и качество МТВ-специфичных CD8⁺ иммунных ответов [176].

Мы в своем исследовании показали, что на 30 сут после иммунизации аттенуированными штаммами *F. tularensis* повышение уровня экспрессии CD69 молекулы на поверхности CD4⁺ и CD19⁺ лимфоцитов коррелировало с продукцией IFN- γ Т-хелперами и В-клетками [8]. Таким образом, оценка экспрессии CD69 молекулы на поверхности лимфоцитов может быть использована в качестве параметра, отражающего эффекторную активность как Т-клеток, так и В-клеток в иммунном ответе после иммунизации штаммами *F. tularensis*.

Суммируя полученные результаты в ходе исследования иммунологических параметров адаптивного иммунитета и результаты по протективности в отношении природных штаммов *F. tularensis* 503 subsp. *holarctica* и *F. tularensis* Schu subsp. *tularensis*, можно заключить, что критериями для оценки напряженности специфического противотуляремийного иммунитета являются уровень экспрессии CD69 молекулы на поверхности Т- и В-клеток и продукция IFN- γ .

Для формирования защиты от туляремии необходимо чтобы вакцинация индуцировала генерацию Т-клеточной иммунологической памяти [226]. Антиген-специфические CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки памяти гетерогенны по своему составу и в процессе иммунного ответа дифференцируются в T_{ЕМ} и T_{СМ} [32]. На мышинной модели длительность сохранения в организме субпопуляций T_{ЕМ} и T_{СМ} в пуле CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов после иммунизации вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ не изучалась. Поэтому мы провели сравнительный анализ динамики изменения субпопуляционного состава и функциональной активности

CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток памяти в отдаленные сроки после иммунизации аттенуированными штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ, *F. tularensis* 15/23-1 Δ recA и *F. tularensis* 15/23-1/*sodB* Δ recA.

Сравнительный анализ данных показал, что с увеличением времени с момента иммунизации происходило угасание эффекторных функций некоторых субпопуляций CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток памяти. В частности, после окончания эффекторной фазы (30 сут) – на 60 сут иммунного ответа на вакцинацию мы наблюдали достоверное уменьшение количества и функциональной активности CD4⁺ T_{ЕМ}, на 90 сут изменений выявлено не было в сравнении с предыдущим поствакцинальным сроком. Процентное содержание функционально активных CD4⁺ T_{СМ} не изменялось и было сопоставимо на 60 и 90 сут после иммунизации: данные клетки продуцировали TNF- α и IFN- γ , а также экспрессировали на своей поверхности маркер активации CD69. Таким образом, в отдаленные сроки после вакцинации исследуемыми штаммами *F. tularensis* различий в процентном содержании и функциональной активности CD4⁺ Т-клеток памяти выявлено не было. Даже спустя 90 сут после иммунизации всеми исследуемыми штаммами детектируются антиген-специфические CD4⁺ Т-клетки памяти с фенотипами T_{ЕМ} и T_{СМ}, продуцирующие цитокины TNF- α и IFN- γ и маркер активации лимфоцитов CD69. Полученные данные объясняют механизм гомологичной защиты до 90 сут после вакцинации мышей при последующем их заражении природным штаммом *F. tularensis* 503 subsp. *holarctica*.

Основное различие между иммунологическими показателями, полученными в отдаленные сроки после вакцинации, заключалось в том, что с увеличением поствакцинального периода снижается количество и функциональная активность CD8⁺ Т-клеток памяти с фенотипами T_{СМ} и T_{ЕМ}. Согласно полученным данным о выживаемости мышей и цитометрического анализа было установлено, что уровень гетерологичной защиты от природного штамма *F. tularensis* Schu subsp. *tularensis* находится в прямой зависимости от времени, прошедшего после вакцинации, и определяется количеством и функциональной активностью CD8⁺ T_{СМ} и T_{ЕМ}.

В последние годы одним из объяснений угасания протективного иммунитета с течением времени против внутриклеточных инфекций является снижение пула долгоживущих T_{CM} [116, 139]. Для формирования долгосрочной защиты необходимо, чтобы вакцина индуцировала генерацию T_{CM} , которые при повторной встрече с антигеном быстро пролиферируют и дифференцируются в T_{EM} , которые в свою очередь за счёт цитокин-продуцирующей активности и контактного цитолиза успешно элиминируют патоген [114, 231, 248]. Поэтому, вероятно, истощение пула $CD8^+ T_{CM}$ с увеличением поствакцинального периода приводит к снижению количества и функциональной активности $CD8^+ T_{EM}$ на 60 и 90 сут после вакцинации туляремиными штаммами.

Таким образом, можно сделать вывод, что для поддержания длительного протективного иммунитета, инициированного иммунизацией аттенуированными штаммами *F. tularensis*, требуется наличие антиген-специфических $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток памяти, продуцирующих $IFN-\gamma$ и $TNF-\alpha$ и экспрессирующих маркер активации $CD69$. Снижение количества и угасание функциональной активности субпопуляций $CD8^+$ Т-клеток памяти в отдаленные сроки после вакцинации приводит к ослаблению гетерологичной защиты при заражении природным штаммом *F. tularensis* Schu subsp. *tularensis*.

Полученные данные раскрывают механизмы формирования долгосрочной гомологичной и гетерологичной защиты у мышей, индуцированной вакцинацией *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производными *F. tularensis* 15/23-1 $\Delta recA$ и *F. tularensis* 15/23-1/*sodB* $\Delta recA$. Выявленные иммунологические механизмы действия туляреминых вакцинных штаммов могут служить основанием для создания новых вакцин с более долгосрочным эффектом гетерологичной защиты от природных штаммов *F. tularensis* subsp. *tularensis*.

ГЛАВА 6. ВЫЯВЛЕНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОЦЕНКИ ПРОТЕКТИВНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ВАКЦИН НА ОСНОВЕ АТТЕНУИРОВАННЫХ ШТАММОВ *F. TULARENSIS*

В ходе работы было установлено, что протективные свойства штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производных *F. tularensis* 15/23-1 Δ recA и 15/23-1/sodB Δ recA сопоставимы во все исследуемые поствакцинальные сроки: в отдаленные сроки вакцинные препараты эффективно защищают мышей при заражении природным штаммом *F. tularensis* 503 гомологичного подвида *holarctica*, в отличие от заражения гетерологичным природным штаммом *F. tularensis* Schu подвида *tularensis*. В главе 5 было показано, что с увеличением времени после вакцинации также снижается способность лимфоцитов активироваться и продуцировать цитокины при стимуляции клеток *in vitro* туляремийным антигеном. Поэтому учитывая ведущую роль клеточного иммунитета в формировании защиты от туляремии, на следующем этапе исследования мы провели корреляционный анализ Спирмена между показателем выживаемости животных при заражении природным штаммом *F. tularensis* Schu и показателями функциональной активности антиген-специфических лимфоцитов 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.

6.1 Корреляционный анализ между показателем выживаемости мышей после заражения природным штаммом *F. tularensis* Schu подвида *tularensis* и уровнем экспрессии CD69 молекулы на антиген-специфических лимфоцитах

На этом этапе исследования был проведен корреляционный анализ между показателем выживаемости животных при заражении природным штаммом

F. tularensis Schu subsp. *tularensis* и иммунологическими показателями, отражающими функциональную активность лимфоцитов. На рисунке 6.1 представлены результаты корреляционного анализа между выживаемостью и уровнем экспрессии CD69 молекулы на поверхности CD8⁺, CD4⁺ и CD19⁺ лимфоцитов.

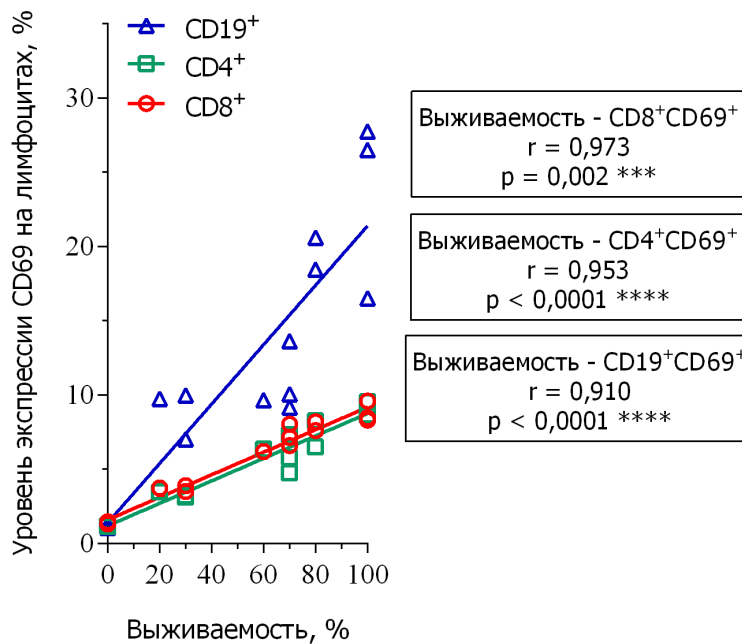


Рисунок 6.1 – Корреляционный анализ между показателем выживаемости мышей линии после заражения природным штаммом *F. tularensis* Schu и уровнем активированных лимфоцитов.

Выявлена прямая корреляционная связь высокой силы по шкале Чеддока между показателем выживаемости животных при заражении природным штаммом *F. tularensis* Schu и долей CD8⁺, CD4⁺ и CD19⁺ лимфоцитов, экспрессирующих маркер ранней активации CD69 (рисунок 6.1).

Полученные данные позволяют заключить, что оценка уровня антиген-индуцированной экспрессии CD69 маркера на поверхности лимфоцитов является адекватным иммунологическим показателем напряженности поствакцинального противотуляремийного иммунитета на мышинной модели.

6.2 Корреляционный анализ между показателями выживаемости мышей после заражения природным штаммом *F. tularensis* Schu подвида *tularensis* и уровнями цитокинов, секретируемых лимфоцитами

Далее мы изучили взаимосвязь показателя выживаемости животных при заражении природным штаммом *F. tularensis* Schu и уровней цитокинов, секретируемых лимфоцитами после *in vitro* стимуляции туляреминым антигеном. Результаты корреляционного анализа представлены на рисунке 6.2.

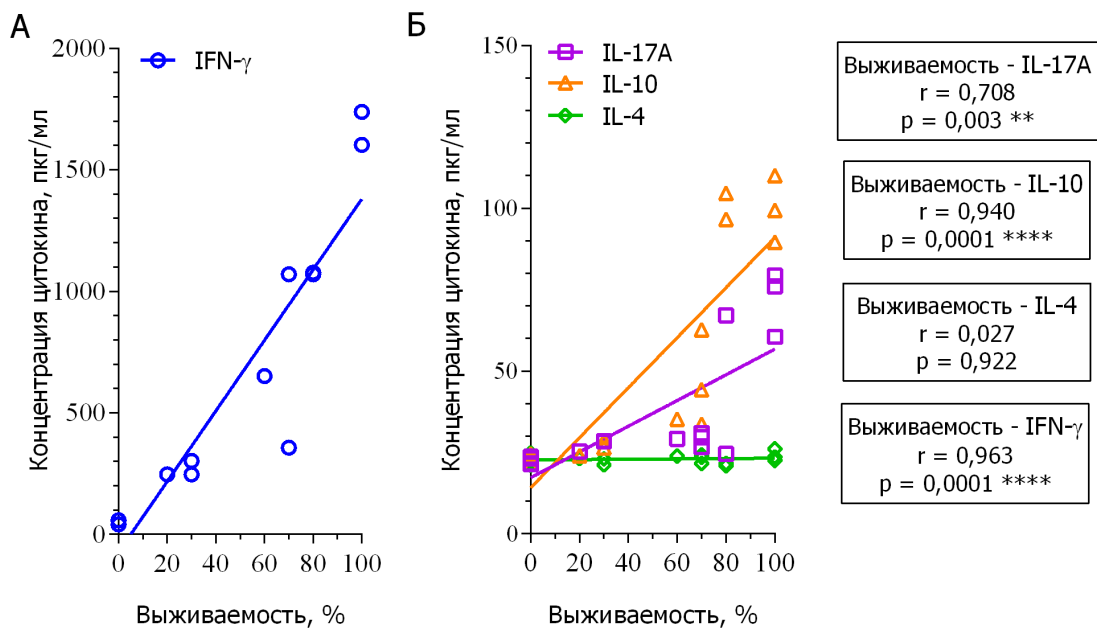


Рисунок 6.2 – Корреляционный анализ между показателем выживаемости мышей линии BALB/с после заражения природным штаммом *F. tularensis* Schu и уровнями цитокинов, секретируемыми антиген-специфическими лимфоцитами.

Примечание: **А** – уровень IFN-γ в клеточном супернатанте лимфоцитов, стимулированных *in vitro* туляреминым антигеном; **Б** – уровни IL-17A, IL-10 и IL-4 в клеточном супернатанте лимфоцитов, стимулированных *in vitro* туляреминым антигеном.

Выявлена прямая корреляционная связь высокой силы между процентом выживших животных при заражении природным штаммом *F. tularensis* Schu и антиген-индуцированным повышением уровней цитокинов IFN-γ и IL-10, синтезируемыми лимфоцитами иммунизированных мышей. При анализе взаимосвязи между показателем выживаемости и уровнем IL-17A выявлена умеренная корреляционная связь ($r = 0,708$; $p = 0,003$), IL-4 – была статистически не значимой ($p = 0,922$).

Таким образом, информативными иммунологическими показателями можно считать IFN- γ и IL-10, рассматривая антиген-индуцированное повышение продукции данных цитокинов в качестве критериев оценки протективной эффективности иммунизации аттенуированными штаммами *F. tularensis* на мышинной модели.

6.3 Корреляционный анализ между показателями выживаемости мышей при заражении природным штаммом *F. tularensis* подвида *tularensis* и функциональной активностью Т-клеток памяти

На этом этапе исследования мы проводили корреляционный анализ между показателем выживаемости животных при заражении природным штаммом *F. tularensis* Schu и показателями функциональной активности антиген-специфических CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток памяти.

В ходе анализа полученных данных выявлена прямая корреляционная связь высокой силы по шкале Чеддока между процентом выживших животных при заражении природным штаммом *F. tularensis* Schu и содержанием Т_{СМ} и Т_{ЕМ} в пуле CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток (рисунок 6.3 А).

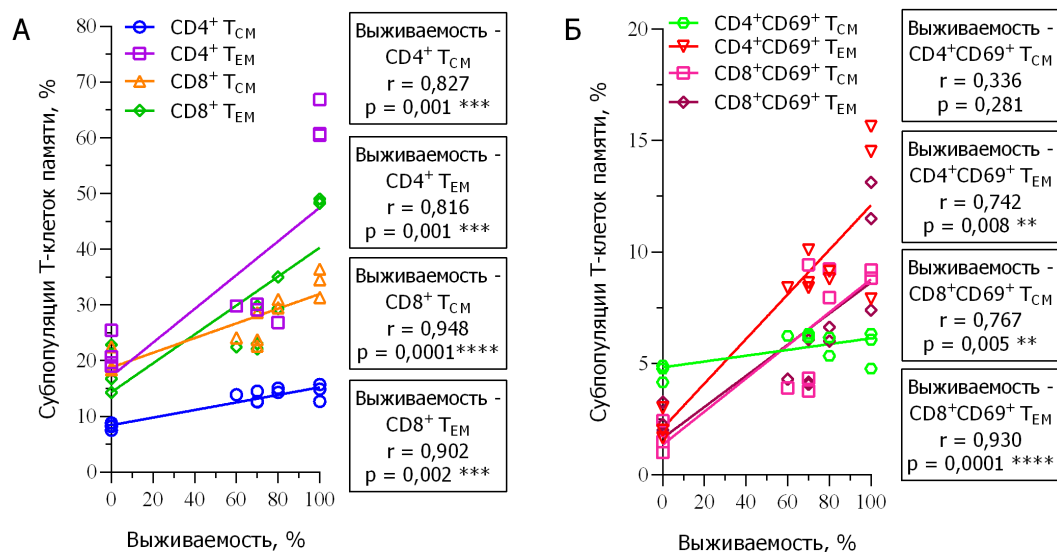


Рисунок 6.3 – Корреляционный анализ между показателем выживаемости мышей линии BALB/с после заражения природным штаммом *F. tularensis* Schu и уровнем содержания субпопуляций Т-клеток памяти.

Анализ взаимосвязи показателя выживаемости и содержания $CD69^+$ Т-клеток памяти выявил корреляционную связь между выживаемостью и повышением доли $CD4^+CD69^+$ T_{EM} , $CD8^+CD69^+$ T_{CM} и $CD8^+CD69^+$ T_{EM} клеток (рисунок 6.3 Б). Корреляционная связь между показателями выживаемости и содержанием $CD4^+CD69^+$ T_{CM} была статистически не значимой ($p = 0,282$).

Таким образом, оценка уровня антиген-индуцированной экспрессии $CD69$ маркера на поверхности $CD8^+$ T_{EM} и T_{CM} , T_{EM} в пуле $CD4^+$ Т-клеток памяти является информативным иммунологическим показателем напряженности поствакцинального противотуляремийного иммунитета у мышей.

На следующем этапе работы мы проводили корреляционный анализ между показателем выживаемости животных при заражении природным штаммом *F. tularensis* Schu и уровнем антиген-специфических $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток памяти, синтезирующих цитокины $IFN-\gamma$ и $TNF-\alpha$. Результаты оценки силы корреляционной связи между данными показателями представлены на рисунке 6.4.

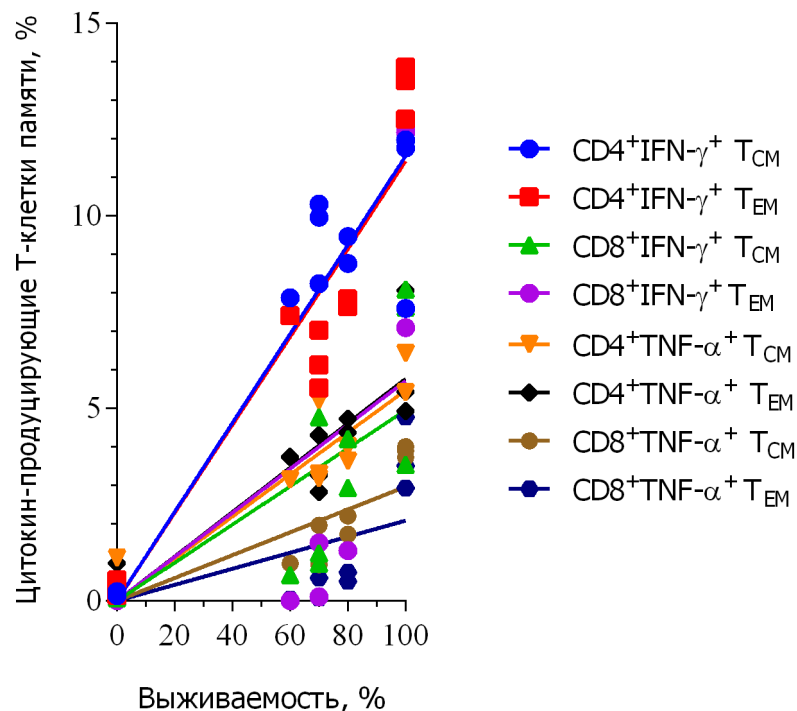


Рисунок 6.4 – Корреляционный анализ между показателем выживаемости мышей линии BALB/с после заражения природным штаммом *F. tularensis* Schu и уровнем цитокин-продуцирующих субпопуляций Т-клеток памяти.

Согласно полученным данным, представленным на рисунке 6.4, выявлена достоверная ($p < 0,05$) сильная прямая корреляционная связь между показателем выживаемости мышей при заражении природным штаммом *F. tularensis* Schu и антиген-индуцированной продукцией IFN- γ Т-клетками памяти с фенотипами CD4⁺ T_{CM} ($r = 0,712$), CD4⁺ T_{EM} ($r = 0,934$), CD8⁺ T_{CM} ($r = 0,889$), CD8⁺ T_{EM} ($r = 0,755$) и продукцией TNF- α с фенотипами CD4⁺TNF- α ⁺ T_{CM} ($r = 0,945$), CD4⁺TNF- α ⁺ T_{EM} ($r = 0,948$), CD8⁺TNF- α ⁺ T_{CM} ($r = 0,945$), CD8⁺TNF- α ⁺ T_{EM} ($r = 0,816$).

6.4 Заключение по Главе 6

При анализе полученных данных о выживаемости мышей и цитометрического анализа была отмечена зависимость уровня гетерологичной защиты иммунных мышей при заражении природным штаммом *F. tularensis* Schu subsp. *tularensis* от функциональной активности антиген-специфических лимфоцитов. На этом этапе работы мы провели корреляционный анализ для выбора иммунологических критериев оценки протективной эффективности иммунизации.

Информативными показателями гетерологичной защиты мышей от заражения природным штаммом *F. tularensis* Schu можно считать IFN- γ , IL-10 и CD69, рассматривая антиген-индуцированное повышение продукции этих цитокинов и экспрессии маркера активации в качестве иммунологических критериев протективной эффективности иммунизации аттенуированными штаммами *F. tularensis*.

Выявленный факт корреляции между повышением доли антиген-специфических Т-клеток памяти, продуцирующих IFN- γ и TNF- α , и экспрессирующих маркер активации CD69, и выживаемостью иммунизированных мышей при заражении природным штаммом *F. tularensis* Schu позволяет сделать вывод о перспективности использования данных иммунологических параметров в качестве критериев оценки протективности поствакцинального иммунитета у мышей.

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 специфических 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 специфических Т- и В-клеток.

Эксперименты по оценке Т-клеточной иммунологической памяти показали, что иммунизация мышей штаммами *F. tularensis* индуцировала формирование антиген-специфических CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток памяти, их дифференцировку на субпопуляции T_{ЕМ} и T_{СМ}, 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_{СМ} и T_{ЕМ} 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 туляремийными штаммами.

Корреляционный анализ между показателем выживаемости мышей после заражения природным штаммом *F. tularensis* Schu subsp. *tularensis* и показателями функциональной активности антиген-специфических 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 $IFN-\gamma$ 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 $IFN-\gamma$ и $TNF-\alpha$ 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 специфических 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_{ЕМ} и T_{СМ}, 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_{СМ} и T_{ЕМ}.

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 ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Разработанная База данных «Показатели противотуляремийного иммунитета на модели мышей линии BALB/с» может быть использована в качестве современного программного обеспечения для изучения иммунного ответа 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ЗФР	- забуференный солевой раствор
КНК	- кислото-нерастворимый комплекс
КОЕ	- Колониеобразующая единица
ИФА	- иммуниферментный анализ
ЛПС	- липополисахарид
ОП	- оптическая плотность
ФБУН ГНЦ ПМБ	- Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный Центр прикладной микробиологии и биотехнологии
RPMI	- среда для культур клеток и тканей
FT	- среда для культивирования туляремиального микроба
<i>IglC</i>	- ген, отвечающий за размножение бактерий <i>F. tularensis</i> в макрофагах
<i>recA</i>	- ген, кодирующий белок RecA
<i>sodB</i>	- супероксиддисмутаза
DCL	- безусловная летальная доза
IL-2	- Интерлейкин 2
IL-4	- Интерлейкин 4
IL-17A	- Интерлейкин 17
IFN- γ	- Интерферон гамма
TNF- α	- Фактор некроза опухоли-альфа
ФБС	- эмбриональная бычья сыворотка
ФСБ	- фосфатно-солевой буфер
ФСБ-Т	- фосфатно-солевой буфер с 0,05 % твин-20
мМ	- миллимоль
м.к.	- микробная клетка
CD	- кластер дифференцировки
CFSE	- флуоресцентный краситель для анализа пролиферации
НИИЭГ	- научно-исследовательский институт эпидемиологии и гигиены
ГКПМ–Оболенск	- Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур – Оболенск
<i>in vitro</i>	- эксперимент «в пробирке», без использования животных
<i>in vivo</i>	- эксперимент на животных
LVS	- штамм <i>F. tularensis</i>
MCP-1	- Моноцитарный хемотаксический фактор-1
MIP-2	- macrophage inflammatory protein 2 (макрофагальный воспалительный белок)
MIP-1 β	- Макрофагальный белок воспаления 1-бета
G-CSF	- Колонистимулирующий фактор гранулоцитов

GM-CSF	- Колонiestимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов
M-CSF	- Колонiestимулирующий фактор макрофагов
IL-1 α	- Интерлейкин 1-альфа
IL-1 β	- Интерлейкин 1-бета
IL-4	- Интерлейкин 4
IL-6	- Интерлейкин 6
IP-10	- Интерферон-индуцибельный белок
MIG	- Макрофагальный белок воспаления 1-альфа
T _{ЕМ}	- эффекторные Т-клетки памяти
T _{СМ}	- центральные Т-клетки памяти

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности: Санитарные правила П 1.3.2322-08: утверждены Главным государственным санитарным врачом РФ 15.04.2008. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008. – 45 с.
2. Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности: Санитарные правила П 1.3.1285-03: утверждены Главным государственным санитарным врачом РФ 15.04.2003. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2003. – 23 с.
3. Волох, О.А. Экспериментальный препарат для специфической профилактики туляремии / О.А. Волох, Е.М. Кузнецова, Е.А. Смолькова, Т.Н. Щуковская, С.А. Бугоркова, Н.Г. Авдеева, Д.Г. Филимонова, Т.П. Шмелькова, С.Н. Ключева, А.К. Никифоров // Пробл. Особо Опасн. Инф. – 2013. – № 2. – С. 73-77. –
4. Горбатов, А.А. Особенности гуморального ответа при экспериментальной туляремии животных с разной чувствительностью к инфекции / А.А. Горбатов, Г.М. Титарева, Т.И. Комбарова, Р.З. Шайхутдинова, Т.Б. Кравченко, Р.И. Миронова, И.В. Бахтеева, Н.В. Аронова, Н.В. Павлович, А.Н. Мокриевич, В.В. Фирстова // Инф. Иммуно. – 2019. – Т. 9, № 2. – С. 262-272. –
5. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. – Санкт-Петерб., – 2010. – 48 с.
6. Дунаева, Т.Н. Туляремия / Т.Н. Дунаева, О.С. Емельянова, И.Н. Майский, Ю.А. Мясников, Н.Г. Олсуфьев, Г.Н. Руднев, Р.А. Савельева, В.С. Сильченко; под ред. Н.Г. Олсуфьева и Г.Н. Руднева – М.: Медгиз, 1960. – 459 с.
7. Карцева, А.С. Сравнение раннего иммунного ответа мышей, иммунизированных тулярийным 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. 22, №3. – С. 1177-1182. – doi: 10.31857/S102872210007250-0

8. 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. – doi: 10.21055/0370-1069-2020-3-62-69

9. Комбарова, Т.И. Сравнительная оценка реактогенности туляремийной вакцины на различных биомоделях / Т.И. Комбарова, В.М. Павлов, Т.Б. Кравченко, Г.М. Титарева, И.В. Бахтеева, А.И. Борзилов, О.В. Коробова, Г.М. Вахрамеева, Р.И. Миронова, А.Н. Мокриевич // Эпидемиол. и Вакцинопроф. – 2013. – Т. 71, № 4. – С. 54-62.

10. Корнева, А.В. Результаты изучения иммуногенной активности клеточных оболочек *Francisella tularensis* разных подвидов (сообщение 1) / А.В. Корнеева, В.Б. Николаев, К.Ю. Ястремская, Е.Ю. Марков, В.В. Войткова, С.Ю. Соловьев, Ю.О. Попова, А.В. Мазепа, В.С. Половинкина // Эпидемиол. и Вакцинопроф. – 2014. – Т. 4, №77. – С. 73–77.

11. Кудрявцева, Т.Ю. Генетическое разнообразие семейства *Francisellaceae*, анализ ситуации по заболеваемости туляремией на территории Российской Федерации в 2021 г / Т.Ю. Кудрявцева, В.П. Попов, А.Н. Мокриевич, Е.С. Куликалова, А.В. Холин, А.В. Мазепа, Д.В. Транквилевский, М.В. Храмов, И.А. Дятлов // Пробл. Особо Опасн. Инф. – 2022. – №. 1. – С. 6-14.

12. Лапин, А.А. Простая жидкая питательная среда для молекулярно-генетических исследований *Francisella tularensis* / А.А. Лапин, В.М. Павлов, А.Н. Мокриевич, Л.В. Домотенко, М.В. Храмов // Пробл. Особо Опасн. Инф. – 2009. – №. 102. – С. 66–67.

13. Лившиц, Ю.И. Требования к качеству лабораторных грызунов и условия их содержания / Ю.И. Лившиц // Руководство по вакцинному и сывороточному делу. – М.: Медицина, 1978. – С. 24-36.

14. Медуницын, Н.В. Вакцинология. / Н.В. Медуницын – М.: «Триада-Х», 2004. – 448 с.
15. Международная статистическая классификация болезней и проблем, связанных со здоровьем: Десятый пересмотр. – Женева: ВОЗ, 1995. – Т.1. - Ч.1. – 698 с.
16. Мокриевич, А.Н. Иммуногенность и реактогенность штамма *Francisella tularensis* 15/23-1ΔrecA – кандидата для создания новой живой туляремийной вакцины / А.Н. Мокриевич, Г.М. Титарева, Т.И. Комбарова, Е.А. Ганина, Т.Б. Кравченко, И.В. Бахтеева, Г.М. Вахрамеева, Р.И. Миронова, А.И. Борзилов, О.В. Коробова, В.М. Павлов, И.А. Дятлов // Эпидемиол. и Вакцинопроф. – 2015. –Т. 14, № 6. – С. 74-86.
17. Мокриевич, А.Н. Молекулярно-генетические подходы к исследованию возбудителя туляремии для целей совершенствования диагностики и специфической профилактики: диссертация ... доктора медицинских наук: 03.02.03, 14.03.09 / А.Н. Мокриевич. // Оболенск. – 2016. – 49 с.
18. Мокриевич, А.Н. Получение и свойства вакцинного штамма туляремийного микроба без одной копии гена *IglC* и без гена *recA* / А.Н. Мокриевич, Г.М. Вахрамеева, Г.М. Титарева, И.В. Бахтеева, Р.И. Миронова, Т.И. Комбарова, Т.Б. Кравченко, И.А. Дятлов, В.М. Павлов // Мол. Ген., Микробиол. и вирусол. – 2015. – Т. 33, № 3. – С. 33-39.
19. Мокриевич, А.Н. Создание и изучение вариантов вакцинного штамма *Francisella tularensis* без генов *IglC*. Сообщение 2. / А.Н. Мокриевич, Г.М. Вахрамеева, Р.И. Миронова, Т.И. Комбарова, И.В. Бахтеева, Г.М. Титарева, Т.Б. Кравченко, И.А. Дятлов, В.М. Павлов // Пробл. Особо Опасн. Инф. – 2013. – № 4. – С. 102-105.
20. Никифоров, В.В. Туляремия: от открытия до наших дней / В.В. Никифоров, Г.Н. Кареткина // Инф. бол. – 2007. – Т. 5, № 1. – С. 67-76.
21. Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим

показаниям: Приказ Министерства здравоохранения РФ от 21 марта 2014 г. № 125н // СПС «Гарант».

22. Олсуфьев, Н.Г. Внутривидовая таксономия возбудителя туляремии *Francisella tularensis*. / Н.Г. Олсуфьев, И.С. Мещерякова // Журнал гигиены, эпидемиологии, микробиологии и иммунологии. – 1982. – № 26. – С. 291-299.

23. Олсуфьев, Н.Г. Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии / Н.Г. Олсуфьев – М.: Медицина, 1975. – 192 с.

24. Олсуфьев, Н.Г. Туляремия. / Н.Г. Олсуфьев, Г.П. Руднев – М.: Медгиз, 1960. – 459 с.

25. Павлов, В.М. Молекулярно-генетические исследования бактерий рода *Francisella* и их прикладное значение / В.М. Павлов, И.А. Дятлов. – М.; 2012. – 267 с.

26. Павлович, Н.В. Прозрачная питательная среда для культивирования *Francisella tularensis* / Н.В. Павлович, Б.Н. Мишанькин // Антибиотики и Мед. биотехнол. – 1987. – № 32. – С. 133-137.

27. Приказ Минздрав соцразвития РФ от 23.08.2010 №708н "Об утверждении Правил лабораторной практики" (Зарегистрировано в Минюсте РФ 13.10.2010 №18713) 2010. – 22 с.

28. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных – Изд-во Национальной Академии, Вашингтон, США. – 1996. – 138 с.

29. Симбирцев, А.С. Цитокины: классификация и биологические функции / А.С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. – 2004. – Т. 3. – №. 2. – С. 16-22.

30. Сомов, А.Н. Антигенные и иммуногенные свойства кислотонерастворимого комплекса *Francisella tularensis* штамма 15 НИИЭГ в растворимой, адсорбированной и микрокапсулированной формах / А.Н. Сомов, Т.Б. Кравченко, В.М. Павлов, Г.М. Вахрамеева, Т.И. Комбарова, Р.И. Миронова, В.В. Фирстова, О.В. Калмантаева, С.С. Ветчинин, А.Н. Мокриевич // Биотехнология. – 2017. – № 5. – С. 23-34.

31. Сотникова, М.А. Биологические свойства штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ со сниженной экспрессией гена *sodB*, кодирующего железозависимую супероксиддисмутазу / М.А. Сотникова, Т.Б. Кравченко, И.В. Бахтеева, Р.И. Миронова, Т.И. Комбарова, А.Н. Мокриевич, В.М. Павлов // Эпидемиол. и Вакцинопроф. – 2016. – Т. 15, № 5 (90). – С. 24-29.
32. Ярилин, А.А. Иммунология по Ярилину. / А.А. Ярилин; под ред. С.А. Недоспасова, Д.В. Купраша. – 2-е изд., испр. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2021. – 808 с.
33. Abel, B. The novel tuberculosis vaccine, AERAS-402, induces robust and polyfunctional CD4⁺ and CD8⁺ T cells in adults / B. Abel, M. Tameris, N. Mansoor, S. Gelderbloem, J. Hughes, D. Abrahams, W.A. Hanekom // Am J Respir Crit Care Med. – 2010. – V. 181, N. 12. – P. 1407-1417.
34. Abplanalp, A.L. TLR-dependent control of *Francisella tularensis* infection and host inflammatory responses / A.L. Abplanalp, I.R. Morris, B.K. Parida, J.M. Teale, M.T. Berton // PLoS One. – 2009. – V. 4, N. 11 – P. e7920.
35. Akira, S. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family / S. Akira, H. Hemmi // Immunol. Lett. – 2003. – V. 85, N. 2. – P. 85-95.
36. Amu, S. Functional characterization of murine CD25 expressing B cells / S. Amu, I. Gjertsson, M. Brisslert // Scand J Immunol. – 2010. – V. 71, N. 4. – P. 275-82.
37. Ancuta, P. Inability of the *Francisella tularensis* lipopolysaccharide to mimic or to antagonize the induction of cell activation by endotoxins / P. Ancuta, T. Pedron, R. Girard, G. Sandström, R. Chaby // Infect Immun. – 1996. – V. 64. – P. 2041-2046.
38. Anderson, R.V. Long lived protection against pneumonic tularemia is correlated with cellular immunity in peripheral, not pulmonary, organs / R.V. Anderson, D.D. Crane, C.M. Bosio // Vaccine. – 2010. – V. 28, N. 40. – P. 6562-6572.
39. Anthony, L.D. Growth of *Francisella* spp. in rodent macrophages / L.D. Anthony, R.D. Burke, F.E. Nano // Infect Immun. – 1991. – V. 59, N. 9. – P. 3291-3296.

40. Apicella, M.A. Identification, characterization and immunogenicity of an O-antigen capsular polysaccharide of *Francisella tularensis* / M.A. Apicella, D.M. Post, A.C. Fowler, B.D. Jones, J.A. Rasmussen, J.R. Hunt, S. Imagawa, B. Choudhury, T.J. Inzana, T.M. Maier, D.W. Frank, T.C. Zahrt, K. Chaloner, M.P. Jennings, M.K. McLendon, B.W. Gibson // PLoS One. – 2010. – V. 5, N. 7. – P. e11060.
41. Ashtekar, A.R. A mucosal subunit vaccine protects against lethal respiratory infection with *Francisella tularensis* LVS / A.R. Ashtekar, J. Katz, Q. Xu, S.M. Michalek // PLoS One. – 2012. – V. 7, N. 11. – P. e50460.
42. Ashtekar, A.R. TLR4-mediated activation of dendritic cells by the heat shock protein DnaK from *Francisella tularensis* / A.R. Ashtekar, P. Zhang, J. Katz, C.C. Deivanayagam, P. Rallabhandi, S.N. Vogel, S.M. Michalek // J Leukoc Biol. – 2008. – V. 84, N. 6. – P. 1434–1446.
43. Bakshi, C.S. An improved vaccine for prevention of respiratory tularemia caused by *Francisella tularensis* SchuS4 strain / C.S. Bakshi, M. Malik, M. Mahawar, G.S. Kirimanjeswara, K.R. Hazlett, L.E. Palmer, M.B. Furie, R. Singh, J.A. Melendez, T.J. Sellati, D.W. Metzger // Vaccine. – 2008. – V. 26, N. 41. – P. 5276–5288.
44. Bakshi, C.S. Superoxide dismutase B gene (*sodB*)-deficient mutants of *Francisella tularensis* demonstrate hypersensitivity to oxidative stress and attenuated virulence / C.S. Bakshi, M. Malik, K. Regan, J.A. Melendez, D.W. Metzger, V.M. Pavlov, T.J. Sellati // J Bacteriol. – 2006. – V. 188, N. 17. – P. 6443-8.
45. Balagopal, A. Characterization of the receptor-ligand pathways important for entry and survival of *Francisella tularensis* in human macrophages / A. Balagopal, A.S. MacFarlane, N. Mohapatra, S. Soni, J.S. Gunn, L.S. Schlesinger // Infect Immun. – 2006. – V. 74, N. 9. – P. 5114-5125.
46. Bar-Haim, E. Interrelationship between dendritic cell trafficking and *Francisella tularensis* dissemination following airway infection / E. Bar-Haim, O. Gat, G. Markel, H. Cohen, A. Shafferman, B. Velan // PLoS Pathog. – 2008. – V. 4. – P. e1000211.

47. Barker, J.R. Molecular and genetic basis of pathogenesis in *Francisella tularensis* / J.R. Barker, K.E. Klose // Ann N Y Acad Sci. – 2007. – V. 1105, N. 1. – P. 138-159.
48. Barker, J.R., The *Francisella tularensis* pathogenicity island encodes a secretion system that is required for phagosome escape and virulence / J.R. Barker, A. Chong, T.D. Wehrly, J.J.Yu, S.A. Rodriguez, J. Liu, J. Celli, B.P. Arulanandam, K.E. Klose // Mol Microbiol. – 2009. – V. 74, N. 6. – P. 1459–1470.
49. Bar-On, L. Protection of vaccinated mice against pneumonic tularemia is associated with an early memory sentinel-response in the lung / L. Bar-On, H. Cohen, U. Elia, S. Rotem, A. Bercovich-Kinori, E. Bar-Haim, O. Cohen // Vaccine. – 2017. – V. 35, N. 50. – P. 7001-7009.
50. Baron, S.D. Inactivated *Francisella tularensis* live vaccine strain protects against respiratory tularemia by intranasal vaccination in an immunoglobulin A-dependent fashion / S.D. Baron, R. Singh, D.W. Metzger // Infect Immun. – 2007. – V. 75, N. 5. – P. 2152–2162.
51. Barrigan, L.M. Infection with *Francisella tularensis* LVS clpB leads to an altered yet protective immune response / L.M. Barrigan, S. Tuladhar, J.C. Brunton, M.D. Woolard, C.J. Chen, D. Saini, R. Frothingham, G.D. Sempowski, T.H. Kawula, J.A. Frelinger // Infect Immun. – 2013. – V. 81, N. 6. – P. 2028-2042.
52. Ben Nasr, A. Critical role for serum opsonins and complement receptors CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) in phagocytosis of *Francisella tularensis* by human dendritic cells (DC): uptake of *Francisella* leads to activation of immature DC and intracellular survival of the bacteria / A. Ben Nasr, J. Haithcoat, J.E. Masterson, J.S. Gunn, T. Eaves-Pyles, G.R. Klimpel // J Leukoc biol. – 2006. – V. 80, N. 4, – P. 774-86.
53. Ben Nasr, A. Subversion of complement activation at the bacterial surface promotes serum resistance and opsonophagocytosis of *Francisella tularensis* / A. Ben Nasr, G.R. Klimpel // J Leukoc biol. – 2008. – V. 84, N. 1. – 77-85.

54. Betts, M.R. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8⁺ T cells / M.R. Betts, M.C. Nason, S.M. West, S.C. De Rosa, S.A. Migueles, J., Abraham, R.A. Koup // *Blood*. – 2006. – V. 107, N. 12. – P. 4781-4789.
55. Beyersdorf, N. CD28 co-stimulation in T-cell homeostasis: a recent perspective / N. Beyersdorf, T. Kerkau, T. Hünig // *Immunotargets Ther.* – 2015. – V. 28, N. 4. – P. 111-122.
56. Boaz, M. J. Presence of HIV-1 Gag-specific IFN- γ ⁺ IL-2⁺ and CD28⁺ IL-2⁺ CD4 T cell responses is associated with nonprogression in HIV-1 infection / M.J. Boaz, A. Waters, S. Murad, P.J. Easterbrook, A. Vyakarnam // *J Immunol.* – 2002. – V. 169, N. 11. – C. 6376-6385.
57. Bokhari, S.M. NK cells and gamma interferon coordinate the formation and function of hepatic granulomas in mice infected with the *Francisella tularensis* live vaccine strain / S.M. Bokhari, K.J. Kim, D.M. Pinson, J. Slusser, H.W. Yeh, M.J. Parmely // *Infect Immun.* – 2008. – V. 76, N. 4. – P. 1379-89.
58. Bönquist, L. MglA and Igl proteins contribute to the modulation of *Francisella tularensis* live vaccine strain-containing phagosomes in murine macrophages / L. Bönquist, H. Lindgren, I. Golovliov, T. Guina, A. Sjöstedt // *Infect Immun.* – 2008. – V. 76, N. 8. – P. 3502–3510.
59. Bosio, C.M. Active suppression of the pulmonary immune response by *Francisella tularensis* Schu4 / C.M. Bosio, H. Bielefeldt-Ohmann, J.T. Belisle // *J Immunol.* – 2007. – V. 178, N. 7. – P. 4538-4547.
60. Bosio, C.M. *Francisella tularensis* induces aberrant activation of pulmonary dendritic cells / C.M. Bosio, S.W. Dow // *J Immunol.* – 2005. – V. 175, N. 10. – P. 6792-801.
61. Bosio, C.M. Susceptibility to secondary *Francisella tularensis* live vaccine strain infection in B-cell-deficient mice is associated with neutrophilia but not with defects in specific T-cell-mediated immunity / C.M. Bosio, K.L. Elkins // *Infect Immun.* – 2001. – V. 69, N. 1. – P. 194-203.

62. Brenner, D.J. Bergey's Manual of systematic bacteriology: volume two: the Proteobacteria, part A introductory essays. / D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley, G.M. Garrity (eds), Boston.: Springer – 2005. – 304 p.
63. Bröms, J.E The role of the *Francisella tularensis* pathogenicity island in type VI secretion, intracellular survival, and modulation of host cell signaling / J.E. Bröms, A. Sjöstedt, M. Lavander // Front Microbiol. – 2010. – V. 1. – P. 136.
64. Broms, J.E. DotU and vgrG, core components of type VI secretion systems, are essential for *Francisella* LVS pathogenicity / J.E. Broms, L. Meyer, M. Lavander, P. Larsson, A. Sjöstedt // PLoS One. – 2012. – V. 7, N.4. – P. e34639.
65. Broms, J.E. Unique substrates secreted by the type VI secretion system of *Francisella tularensis* during intramacrophage infection / J.E. Broms, L. Meyer, K. Sun, M. Lavander, A. Sjöstedt // PLoS One. – 2012. – V. 7, N. 11. – P. e50473.
66. Caruso, A.M. Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN- γ , yet succumb to tuberculosis / A.M. Caruso, N. Serbina, E. Klein, K. Triebold, B.R. Bloom, J.L. Flynn // J Immun. – 1999. – V. 162, N. 9. – P. 5407-5416.
67. Celli, J. Mechanisms of *Francisella tularensis* intracellular pathogenesis / J. Celli, T.C. Zahrt // Cold Spring Harb Perspect Med. – 2013. – V.3, N. 4. P.a010314.
68. Chase, J.C. Direct and indirect impairment of human dendritic cell function by virulent *Francisella tularensis* Schu S4 / J.C. Chase, J. Celli, C.M. Bosio // Infect Immun. – V. 77, N. 1. – P. 180-195.
69. Chase, J.C. The presence of CD14 overcomes evasion of innate immune responses by virulent *Francisella tularensis* in human dendritic cells *in vitro* and pulmonary cells *in vivo* / J.C. Chase, C.M. Bosio // Infect Immun. – 2010. – V. 78, N. 1. – P. 154-167.
70. Chen, W. Susceptibility of immunodeficient mice to aerosol and systemic infection with virulent strains of *Francisella tularensis* / W. Chen, R. KuoLee, H. Shen, J.W. Conlan // Microb. pathog. – 2004. – V. 36, N. 6. – 311-318.
71. Chen, W. Toll-like receptor 4 (TLR4) plays a relatively minor role in murine defense against primary intradermal infection with *Francisella tularensis* LVS / W.

Chen, R. Kuolee, H. Shen, M. Bùsa, J.W. Conlan // Immunol. Lett. – 2005. – V. 97, N. 1. – P. 151-4.

72. Chong, A. The early phagosomal stage of *Francisella tularensis* determines optimal phagosomal escape and *Francisella* pathogenicity island protein expression / A. Chong, T.D. Wehrly, V. Nair, E.R. Fischer, J.R. Barker, K.E. Klose, J. Celli // Infect Immun. – 2008. – V. 76, N. 12. – P. 5488-99.

73. Chou, A.Y. Generation of protection against *Francisella novicida* in mice depends on the pathogenicity protein pdpA, but not pdpC or pdpD / A.Y. Chou, N.J. Kennett, E.B. Nix, C.L. Schmerk, F.E. Nano, K.L. Elkins // Microbes Infect. – 2013. – V. 15, N. 12. – P. 816–827.

74. Clay, C.D. Schlesinger L.S. Evasion of complement-mediated lysis and complement C3 deposition are regulated by *Francisella tularensis* lipopolysaccharide O antigen / C.D. Clay, S. Soni, J.S. Gunn, L.S. Schlesinger // J Immun. – 2008. – V. 181, N. 8. – P. 5568-5578.

75. Clemens, D.L. *Francisella tularensis* enters macrophages via a novel process involving pseudopod loops / D.L. Clemens, B.Y. Lee, M.A. Horwitz // Infect Immun. – 2005. – V. 73, N. 9. – P. 5892-5902.

76. Clemens, D.L. Virulent and avirulent strains of *Francisella tularensis* prevent acidification and maturation of their phagosomes and escape into the cytoplasm in human macrophages / D.L. Clemens, B.Y. Lee, M.A. Horwitz // Infect Immun. – 2004. – V. 72, N. 6. – P. 3204-3217.

77. Cole, L.E. Phagosomal retention of *Francisella tularensis* results in TIRAP/Mal-independent TLR2 signaling / L.E. Cole, M.H. Laird, A. Seekatz, A. Santiago, Z. Jiang, E. Barry, K.A. Shirey, K.A. Fitzgerald, S.N. Vogel // J Leukoc Biol. – 2010. – V. 87, N. 2. – P. 275-81.

78. Cole, L.E. Role of TLR signaling in *Francisella tularensis*-LPS-induced, antibody-mediated protection against *Francisella tularensis* challenge / L.E. Cole, B.J. Mann, K.A. Shirey, K. Richard, Y. Yang, P.J. Gearhart, K.L. Chesko, R.M. Viscardi, S.N. Vogel // J Leukoc Biol. – 2011. – V. 90, N. 4. – P. 787-97.

79. Cole, L.E. Toll-like receptor 2-mediated signaling requirements for *Francisella tularensis* live vaccine strain infection of murine macrophages / L.E. Cole, K.A. Shirey, E. Barry, A. Santiago, P. Rallabhandi, K.L. Elkins, A.C. Puche, S.M. Michalek, S.N. Vogel // Infect Immun. – 2007. – V. 75, N. 8. – P. 4127-37.
80. Collazo, C.M. cells from lungs and livers of *Francisella tularensis*-immune mice control the growth of intracellular bacteria / C.M. Collazo, A.I. Meierovics, R. De Pascalis, T.H. Wu, C.R. Lyons, K.L. Elkins // Infect Immun. – 2009. – V. 77, N. 5. – P. 2010-21.
81. Collazo, C.M. Myeloid differentiation factor-88 (MyD88) is essential for control of primary in vivo *Francisella tularensis* LVS infection, but not for control of intra-macrophage bacterial replication / C.M. Collazo, A. Sher, A.I. Meierovics, K.L. Elkins // Microbes and infection. – 2006. – V. 8, N. 3 – P. 779–790.
82. Collazo, C.M. T cells from lungs and livers of *Francisella tularensis*-immune mice control the growth of intracellular bacteria / C.M. Collazo, A.I. Meierovics, R. De Pascalis, T.H. Wu, C.R. Lyons, K.L. Elkins // Infect Immun. – 2009. – V. 77, N. 5. – P. 2010-2021.
83. Colquhoun, D.J. *Francisella* infections in farmed and wild aquatic organisms / D.J. Colquhoun, S. Duodu // Vet Res. – 2011. – V. 8. – P. 42-47.
84. Combadiere, B. Distinct time effects of vaccination on long-term proliferative and IFN- γ -producing T cell memory to smallpox in humans / B. Combadiere, A. Boissonnas, G. Carcelain, E. Lefranc, A. Samri, F. Bricaire, P. Debre, B. Autran // J Exp Med. – 2004. – V. 199, N. 11. – P. 1585-1593.
85. Conlan, J.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 alphabeta T cell- and interferon gamma- dependent mechanism / J.W. Conlan, H. Shen, R. Kuolee, X. Zhao, W. Chen // Vaccine. – 2005. – V. 23, N. 19. – P. 2477-2485.
86. Conlan, J.W. Different host defences are required to protect mice from primary systemic vs pulmonary infection with the facultative intracellular bacterial

pathogen, *Francisella tularensis* LVS / J.W. Conlan, R. KuoLee, H. Shen, A. Webb // Microb Pathog. – 2002. – V. 32, N. 3. – P. 127-134.

87. Conlan, J.W. Mice vaccinated with the O-antigen of *Francisella tularensis* LVS lipopolysaccharide conjugated to bovine serum albumin develop varying degrees of protective immunity against systemic or aerosol challenge with virulent type A and type B strains of the pathogen / J.W. Conlan, H. Shen, A. Webb, M.B. Perry // Vaccine. – 2002. – V. 20, N. 29–30. – P. 3465–3471.

88. Conlan, J.W. Tularemia vaccines: recent developments and remaining hurdles / J.W. Conlan // Future Microbiol. – 2011. – V. 6, N. 4. – P. 391-405. – doi: 10.2217/fmb.11.22

89. Conlan, J.W. Vaccines against *Francisella tularensis* – past, present and future / J.W. Conlan // Expert Rev Vaccines. – 2004. – V. 3, N. 3. – P. 307-314.

90. Conlan, J.W. Vaccines against *Francisella tularensis* / J.W. Conlan, P.C. Oyston // Ann N Y Acad Sci. – 2007. – V. 1105, N. 1. – P. 325-350.

91. Cowley, S.C. CD4⁺CD8⁺ T cells control intracellular bacterial infections both *in vitro* and *in vivo* / S.C. Cowley, E. Hamilton, J.A. Frelinger, J. Su, J. Forman, K.L. Elkins // J Exp Med. – 2005. – V. 202, N. 2. – 309-319.

92. Cowley, S.C. Differential requirements by CD4⁺ and CD8⁺ T cells for soluble and membrane TNF in control of *Francisella tularensis* live vaccine strain intramacrophage growth / S.C. Cowley, J.D. Sedgwick, K.L. Elkins // J Immunol. – 2007. – V. 179, N. 11. – P. 7709-7719.

93. Cowley, S.C. Immunity to *Francisella* / S.C. Cowley, K.L. Elkins // Front Microbiol. – 2011. – V. 2. P. 26.

94. Cowley, S.C. Lung CD4⁺CD8⁺ double-negative T cells are prominent producers of IL-17A and IFN- γ during primary respiratory murine infection with *Francisella tularensis* live vaccine strain / S.C. Cowley, A.I. Meierovics, J.A. Frelinger, Y. Iwakura, K.L. Elkins // Journal of immunology. – 2010. – V. 184, N. 10. – P. 5791-5801.

95. Crane, D.D. A novel role for plasmin-mediated degradation of opsonizing antibody in the evasion of host immunity by virulent, but not attenuated,

Francisella tularensis / D.D. Crane, S.L. Warner, C.M. Bosio // J Immunol. – 2009. – V. 183, N. 7. – P. 4593-4600.

96. Crane, D.D. Generation of a convalescent model of virulent *Francisella tularensis* infection for assessment of host requirements for survival of tularemia / D.D. Crane, D.P. Scott, C.M. Bosio // PLoS One. – 2012. – V. 7, N. 3. – P. e33349.

97. Culkin, S.J. A novel role for B cells in early protective immunity to an intracellular pathogen, *Francisella tularensis* strain LVS / S.J. Culkin, T. Rhinehart-Jones, K.L. Elkins // J Immunol. – 1997. – V. 158, N. 7. – P. 3277-3284.

98. Dai, S. Fine tuning inflammation at the front door: macrophage complement receptor 3-mediates phagocytosis and immune suppression for *Francisella tularensis* / S. Dai, M.V. Rajaram, H.M. Curry, R. Leander, L.S. Schlesinger // PLoS pathogens. – 2013. – V. 9, N. 1. – P. e1003114.

99. Dai, S. Regulation of *Francisella tularensis* virulence / S. Dai, N.P. Mohapatra, L.S. Schlesinger, J.S. Gunn. // Front Microbiol. – 2011. – V. 1. P. 144.

100. Darrah, P.A. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major* / P.A. Darrah, D.T. Patel, P.M. De Luca, R.W. Lindsay, D.F. Davey, B.J. Flynn, S.T. Hoff, P. Andersen, S.G. Reed, S.L. Morris, M. Roederer, R.A. Seder // Nat Med. – 2007. – V. 13, N. 7. – P. 843-50.

101. de Bruin, O.M. The biochemical properties of the *Francisella* pathogenicity island (FPI)-encoded proteins IglA, IglB, IglC, PdpB and DotU suggest roles in type VI secretion / O.M. de Bruin, B.N. Duplantis, J.S. Ludu, R.F. Hare, E.B. Nix, C.L. Schmerk, C.S. Robb, A.B. Boraston, K. Hueffer, F.E. Nano // Microbiol. – 2011. – V. 157, N. 12. – P. 3483.

102. De Pascalis, R. Diverse myeloid and lymphoid cell subpopulations produce gamma interferon during early innate immune responses to *Francisella tularensis* live vaccine strain / R. De Pascalis, B.C. Taylor, K.L. Elkins // Infect Immun. – 2008. – V. 76, N. 9. – P. 4311-4321.

103. Duckett, N.S. Intranasal interleukin-12 treatment for protection against respiratory infection with the *Francisella tularensis* live vaccine strain / N.S. Duckett,

S. Olmos, D.M. Durrant, D.W. Metzger // Infect Immun. – 2005. – V. 73, – N. 4. – 2306-2311.

104. Dudani, R. Multiple mechanisms compensate to enhance tumor-protective CD8⁺ T cell response in the long-term despite poor CD8⁺ T cell priming initially: comparison between an acute versus a chronic intracellular bacterium expressing a model antigen / R. Dudani, Y. Chapdelaine, H. van Faassen, D.K. Smith, H. Shen, L. Krishnan, S. Sad // J Immunol. – 2002. – V. 168, N. 11. – P. 5737-5745.

105. Edwards, J.A. Restricted cytosolic growth of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* by IFN-gamma activation of macrophages / J.A. Edwards, D. Rockx-Brouwer, V. Nair, J. Celli // Microbiol. (Reading, England). – 2010. – V. 156, N. 2. – P. 327-339.

106. Eigelsbach, H.T. Prophylactic effectiveness of live and killed tularemia vaccines. I. Production of vaccine and evaluation in the white mouse and guinea pig / H.T. Eigelsbach, C.M. Downs // J Immunol. – 1961. – V. 87. – P. 415–425.

107. Elkins, K.L. Importance of B cells, but not specific antibodies, in primary and secondary protective immunity to the intracellular bacterium *Francisella tularensis* live vaccine strain / K.L. Elkins, C.M. Bosio, T.R. Rhinehart-Jones // Infect Immun. – 1999. – V. 67, N. 11. – P. 6002.

108. Elkins, K.L. Innate and adaptive immunity to *Francisella* / K.L. Elkins, S.C. Cowley, C.M. Bosio // Ann N Y Acad Sci. – 2007. – V. 1105. – P. 284–324.

109. Elkins, K.L. Minimal requirements for murine resistance to infection with *Francisella tularensis* LVS / K.L. Elkins, T.R. Rhinehart-Jones, S.J. Culkin, D. Yee, R.K. Winegar // Infect Immun. – 1996. – V. 64, N. 8. – P. 3288-3293.

110. Elkins, K.L. Progress, challenges, and opportunities in *Francisella* vaccine development / K.L. Elkins, S.L. Kurtz, R. De Pascalis // Expert Rev Vaccines. – 2016. – V. 15, N. 9. – P. 1183-1196.

111. Elkins, K.L. T-cell-independent resistance to infection and generation of immunity to *Francisella tularensis* / K.L. Elkins, T. Rhinehart-Jones, C.A. Nacy, R.K. Winegar, A.H. Fortier // Infect Immun. – 1993. – V. 61, N. 3. – P. 823-829.

112. Ellis, J. Tularemia / J. Ellis, P.C. Oyston, M. Green, R.W. Titball // Clin Microbiol. Rev. – 2002. – V. 15, N. 4. – P. 631–646.
113. Eneslätt, K. Signatures of T cells as correlates of immunity to *Francisella tularensis* / K. Eneslätt, M. Normark, R. Björk, C. Rietz, C. Zingmark, L.A. Wolfrain, S. Stöven, A. Sjöstedt // PloS one. – 2012. – V. 7, N. 3. – P. e32367.
114. Eneslätt, K. Vaccine-Mediated mechanisms controlling replication of *Francisella tularensis* in human peripheral blood mononuclear cells using a co-culture system / K. Eneslätt, I. Golovliov, P. Rydén, A. Sjöstedt // Fron Cell Infect Microbiol. – 2018. – V. 8, N. 27.
115. Ericsson, M. Persistence of cell-mediated immunity and decline of humoral immunity to the intracellular bacterium *Francisella tularensis* 25 years after natural infection / M. Ericsson, G. Sandström, A. Sjöstedt, A. Tärnvik // J Infect Dis. – 1994. – V. 170, N. 1. – P. 110-114.
116. Esser, M.T. Memory T cells and vaccines / M.T. Esser, R.D. Marchese, L.S. Kierstead, L.G. Tussey, F. Wang, N. Chirmule, M.W. Washabaugh // Vaccine. – 2003. – V. 21, N. 5-6. – P. 419-430.
117. Eyles, J.E. Protection afforded against aerosol challenge by systemic immunisation with inactivated *Francisella tularensis* live vaccine strain (LVS) / J.E. Eyles, M.G. Hartley, T.R. Laws, P.C. Oyston, K.F. Griffin, R.W. Titball // Microb Pathog. – 2008. – V. 44, N. 2. – P. 164–168.
118. Fabrik, I. The early dendritic cell signaling induced by virulent *Francisella tularensis* strain occurs in phases and involves the activation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) and p38 in the later stage / I. Fabrik, M. Link, D. Putzova, L. Plzakova, Z. Lubovska, V. Philimonenko, I. Pavkova, P. Rehulka, Z. Krocova, P. Hozak, M. Santic, J. Stulik, // Mol Cell Proteomics. – 2018. – V. 17, N. 1. – P. 81-94.
119. Fernandes-Alnemri, T. The AIM2 inflammasome is critical for innate immunity to *Francisella tularensis* / T. Fernandes-Alnemri, J.W. Yu, C. Juliana, L. Solorzano, S. Kang, J. Wu, P. Datta, M. McCormick, L. Huang, E. McDermott, L. Eisenlohr, C.P. Landel, E.S. Alnemri // Nat Immunol. – 2010. – V. 11, N. 5. – P. 385-93.

120. Fink, A. Early interactions of murine macrophages with *Francisella tularensis* map to mouse chromosome 19 / A. Fink, M.A. Hassan, N.A. Okan, M. Sheffer, A. Camejo, J.P. Saeij, D.L. Kasper // MBio. – 2016. – V. 7, N. 2. – P. e02243-15.
121. Forestal, C.A. *Francisella tularensis* has a significant extracellular phase in infected mice / C.A. Forestal, M. Malik, S.V. Catlett, A.G. Savitt, J.L. Benach, T.J. Sellati, M.B. Furie // J Infect Dis. – 2007. – V. 196, N. 1. – P. 134-137.
122. Foshay, L. A comparative study of the treatment of tularemia with immune serum, hyperimmune serum and streptomycin / L. Foshay // Am J Med. – 1946. – V. 1, N. 2. – P. 180-188.
123. Foshay, L. Vaccine prophylaxis against tularemia in man / L. Foshay, W.H. Hesselbrock, H.J. Wittenberg, A.H. Rodenberg // Am J Public Health Nations Health. – 1942. – V. 32, N. 10. – P. 1131–1145.
124. Fuller, C.L. Transcriptome analysis of human immune responses following live vaccine strain (LVS) *Francisella tularensis* vaccination / C.L. Fuller, K.C. Brittingham, M.W. Porter, M.J. Hepburn, P.L. Petitt, P.R. Pittman, S. Bavari // Mol Immunol. – 2007. – V. 44, N. 12. – P. 3173-3184.
125. Fulop, M. Role of antibody to lipopolysaccharide in protection against low- and high-virulence strains of *Francisella tularensis* / M. Fulop, P. Mastroeni, M. Green, R.W. Titball // Vaccine. – 2001. – V. 19, N. 31. – P. 4465–4472.
126. Geier, H. Phagocytic receptors dictate phagosomal escape and intracellular proliferation of *Francisella tularensis* / H. Geier, J. Celli // Infect Immun. – 2011. – V. 79, N. 6. – P. 2204-14.
127. Gillette, D.D. Virulent Type A *Francisella tularensis* actively suppresses cytokine responses in human monocytes / D.D. Gillette, H.M. Curry, T. Cremer, D. Ravneberg, K. Fatehchand, P.A. Shah, M.D. Wewers, L.S. Schlesinger, J.P. Butchar, S. Tridandapani, M.A Gavrilin // Front Cell Infect Microbiol. – 2014. – V. 4. – P.45.
128. Golovliov, I. An attenuated strain of the facultative intracellular bacterium *Francisella tularensis* can escape the phagosome of monocytic cells / I. Golovliov, V.

Baranov, Z. Krocova, H. Kovarova, A. Sjöstedt // Infect Immun. – 2003. – V. 71, N. 10. – P. 5940-5950.

129. Golovliov, I. An *in vitro* co-culture mouse model demonstrates efficient vaccine-mediated control of *Francisella tularensis* Schu S4 and identifies nitric oxide as a predictor of efficacy / I. Golovliov, H. Lindgren, K. Eneslätt, W. Conlan, A. Mosnier, T. Henry, A. Sjöstedt // Front Cell Infect Microbiol. – 2016. – V. 6. – P. 152.

130. Gray, J.I. The roles of resident, central and effector memory CD4 T-cells in protective immunity following infection or vaccination / J.I. Gray, L.M. Westerhof, M.K.L. MacLeod // Immunol. – 2018. – V. 154, N. 4. – P. 574–81.

131. Griffin, A.J. Successful protection against tularemia in C57BL/6 mice is correlated with expansion of *Francisella tularensis*-specific effector T cells / A.J. Griffin, D.D. Crane, T.D. Wehrly, C.M. Bosio // Clin Vacc Immunol. – 2015. – V. 22, N. 1. – P. 119-128.

132. Gunn, J.S. The structure and function of *Francisella* lipopolysaccharide/ J.S. Gunn, R.K. Ernst // Ann N Y Acad Sci. – 2007. – V. 1105. – P. 202.

133. Guo, Y. CD30 is required for activation of a unique subset of interleukin-17A-producing $\gamma\delta$ T cells in innate immunity against *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin infection / Y. Guo, X. Sun, K. Shibata, H. Yamada, H. Muta, E.R. Podack, Y. Yoshikai // Infect Immun. – 2013. – V. 81, N. 10. – P. 3923-3934.

134. Hajjar, A.M. Lack of *in vitro* and *in vivo* recognition of *Francisella tularensis* subspecies lipopolysaccharide by Toll-like receptors / A.M. Hajjar, M.D. Harvey, S.A. Shaffer, D.R. Goodlett, A. Sjöstedt, H. Edebro, M. Forsman, M. Byström, M. Pelletier, C.B. Wilson, S.I. Miller, S.J. Skerrett, R.K. Ernst // Infect Immun. – 2006. – V. 74. – P. 6730–6738.

135. Hall, J.D. Infected-host-cell repertoire and cellular response in the lung following inhalation of *Francisella tularensis* Schu S4, LVS, or U112 / J.D. Hall, M.D. Woolard, B.M. Gunn, R.R. Craven, S. Taft-Benz, J.A. Frelinger, TH. Kawula // Infect Immun. – 2008. – V. 76, N. 12. – P. 5843-52.

136. Harris, D.P. Cutting edge: the development of IL-4-producing B cells (B effector 2 cells) is controlled by IL-4, IL-4 receptor alpha, and Th2 cells / D.P. Harris,

S. Goodrich, K. Mohrs, M. Mohrs, F.E. Lund // J Immunol. – 2005. – V. 175, N. 11. – P. 7103-7107.

137. Harris, D.P. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells / D.P. Harris, L. Haynes, P.C. Sayles, D.K. Duso, S.M. Eaton, N.M. Lepak, L.L. Johnson, S.L. Swain, F.E. Lund // Nat Immunol. – 2000. – V. 1, N. 6. – P. 475-482.

138. Harris, D.P. Regulation of IFN-gamma production by B effector 1 cells: essential roles for T-bet and the IFN-gamma receptor / D.P. Harris, S. Goodrich, A.J. Gerth, S.L. Peng, F.E. Lund // J Immunol. – 2005. – V. 174, N. 11. – P. 6781-6790.

139. Henao-Tamayo, M.I. Phenotypic definition of effector and memory T-lymphocyte subsets in mice chronically infected with *Mycobacterium tuberculosis* / M. I. Henao-Tamayo, D.J. Ordway, S.M. Irwin, S. Shang, C. Shanley, I.M. Orme // Clin Vacc Immunol. – 2010. – V. 17, N. 4. – P. 618-625.

140. Hope, J.C. Identification of surrogates and correlates of protection in protective immunity against *Mycobacterium bovis* infection induced in neonatal calves by vaccination with *M. bovis* BCG Pasteur and *M. bovis* BCG Danish / J.C. Hope, M.L. Thom, M. McAulay, E. Mead, H.M. Vordermeier, D. Clifford, R.G. Hewinson, B. Villarreal-Ramos // Clin Vacc Immunol. – 2011. – V. 18, N. 3. – P. 373-379.

141. Hrstka, R. The role of MAPK signal pathways during *Francisella tularensis* LVS infection-induced apoptosis in murine macrophages / R. Hrstka, J. Stulik, B. Vojtesek // Microb Infect. – 2005. – V. 7, N. 4. – P. 619-25.

142. Huber, B. Description of *Francisella hispaniensis* sp. nov., isolated from human blood, re-classification of *Francisella novicida* (Larson et al. 1955) Olsufiev et al. 1959 as *Francisella tularensis* subsp. *novicida* comb. nov. and emended description of the genus *Francisella* / B. Huber, R. Escudero, H.J. Busse E. Seibold, H.C. Scholz, P. Anda, P. Kampf, W.D. Splettstoesser // Int J Syst Evol Microbiol. – 2010. – V. 60. – P. 1887-1896.

143. Hurdayal, R. IL-4-producing B cells regulate T helper cell dichotomy in type 1- and type 2-controlled diseases / R. Hurdayal, H.H. Ndlovu, M. Revaz-Breton,

S.P. Parihar, J.K. Nono, M. Govender, F. Brombacher // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2017. – V. 114, N. 40. – P. E8430-E8439.

144. Iwasaki, A. Control of adaptive immunity by the innate immune system / A. Iwasaki, R. Medzhitov // Nat immunol. – 2015. – V. 16, N. 4. – P. 343-53.

145. Janovská, S. Proteomic analysis of antibody response in a case of laboratory-acquired infection with *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* / S. Janovská, I. Pávková, M. Reichelová, M. Hubáleka, J. Stulík, A. Macela // Folia Microbiol (Praha). – 2007. – V. 52, N. 2. – P. 194-8.

146. Jia, Q. Live attenuated tularemia vaccines for protection against respiratory challenge with virulent *F. tularensis* subsp. *tularensis* / Q. Jia, M.A. Horwitz // Frontiers in cellular and infection microbiology. – 2018. – V. 8. – P. 154.

147. Jones, B.D. Uncovering the components of the *Francisella tularensis* virulence stealth strategy / B.D. Jones, M. Faron, J.A. Rasmussen, J.R. Fletcher // Front Cell Infect Microbiol. – 2014. – V.4. – P. 32.

148. Karttunen, R. *Francisella tularensis*-induced *in vitro* gamma interferon, tumor necrosis factor alpha, and interleukin 2 responses appear within 2 weeks of tularemia vaccination in human beings / R. Karttunen, H.M. Surcel, G. Andersson, H.P. Ekre, E. Herva // J Clin Microbiol. – 1991. – V. 29, N. 4. – P. 753.

149. Katz, J. Toll-like receptor 2 is required for inflammatory responses to *Francisella tularensis* LVS / J. Katz, P. Zhang, M. Martin, S.N. Vogel, S.M. Michalek // Infect Immun. – 2006. – V. 74, N. 5. – P. 2809–2816.

150. Kawamura, I. IFN-gamma-producing ability as a possible marker for the protective T cells against *Mycobacterium bovis* BCG in mice / I. Kawamura, H. Tsukada, H. Yoshikawa, M. Fujita, K. Nomoto, M. Mitsuyama // J Immunol. – 1992. – V. 148, N. 9. – P. 2887-2893.

151. Keating, S.M. Durable human memory T cells quantifiable by cultured enzyme-linked immunospot assays are induced by heterologous prime boost immunization and correlate with protection against malaria / S.M. Keating, P. Bejon, T. Berthoud, J.M. Vuola, S. Todryk, D.P. Webster, S.J. Dunachie, V.S. Moorthy, S.J.

McConkey, S.C. Gilbert, A.V. Hill // J Immunol. – 2005. – V. 175, N. 9. – P. 5675-5680.

152. Ketavarapu, J.M. Mast cells inhibit intramacrophage *Francisella tularensis* replication via contact and secreted products including IL-4 / J.M. Ketavarapu, A.R. Rodriguez, J.J. Yu, Y. Cong, A.K. Murthy, T.G. Forsthuber, M.N. Guentzel, K.E. Klose, M.T. Berton, B.P. Arulanandam // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2008. – V. 105, N. 27. – P. 9313-9318.

153. Khatenever, L.M. The allergic diagnosis, specific prophylaxis and vaccinothrapy of tularemia / L.M. Khatenever, E.B. Balsky, I.G. Kochergin, V.V. Porin // Microbiology and epidemiology. English Edition, Medical Publications, Ltd., London, – 1943. – P. 62-79.

154. Kim, Y.K. NOD-like receptors in infection, immunity, and diseases / Y.K. Kim, J.S. Shin, M.H. Nahm // Yonsei Med J. – 2016. – V. 57, N. 1. – P. 5.

155. Kinkead, L.C. Multifaceted effects of *Francisella tularensis* on human neutrophil function and lifespan / L.C. Kinkead, L.A.H. Allen // Immunol Rev. – 2016. – V. 273, N. 1. – P. 266-281.

156. Kinkead, L.C. *Francisella novicida* inhibits spontaneous apoptosis and extends human neutrophil lifespan / L.C. Kinkead, D.C. Fayram, L.A.H. Allen // J Leukoc Biol. – 2017. – V. 102, N. 3. – P. 815-828.

157. Kirimanjeswara, G.S. Humoral and cell-mediated immunity to the intracellular pathogen *Francisella tularensis* / G.S. Kirimanjeswara, S. Olmos, C.S. Bakshi, D.W. Metzger // Immunol Rev. – 2008. – V. 225. – P. 244-255.

158. Kirimanjeswara, G.S. Prophylactic and therapeutic use of antibodies for protection against respiratory infection with *Francisella tularensis* / G.S. Kirimanjeswara, J.M. Golden, C.S. Bakshi, D.W. Metzger // J Immunol. – 2007. – V. 179, N. 1. – P. 532-539.

159. Klimpel, G.R. Levofloxacin rescues mice from lethal intra-nasal infections with virulent *Francisella tularensis* and induces immunity and production of protective antibody / G.R. Klimpel, T. Eaves-Pyles, S.T. Moen, J. Taormina, J.W. Peterson, A.K.

Chopra, D.W. Niesel, P. Carness, J.L. Haithcoat, M. Kirtley, A.B. Nasr // *Vaccine*. – 2008. – V. 26, N. 52. – P. 6874-6882.

160. Koskela, P. Cell-mediated and humoral immunity induced by a live *Francisella tularensis* vaccine / P. Koskela, E. Herva // *Infect Immun*. – 1982. – V. 36, N. 3. – P. 983-989.

161. Koskela, P. Humoral immunity induced by a live *Francisella tularensis* vaccine. Complement fixing antibodies determined by an enzyme-linked immunosorbent assay (CF-ELISA) / P. Koskela // *Vaccine*. – 1985. – V. 3, N. 5. – P. 389-391.

162. Krocova, Z. Innate immune recognition: implications for the interaction of *Francisella tularensis* with the host immune system / Z. Krocova, A. Macela, K. Kubelkova // *Front Cell Infect Microbiol*. – 2017. – V. 16, N. 7. – P. 446.

163. Kubelkova, K. Innate immune recognition: an issue more complex than expected / K. Kubelkova, A. Macela // *Front Cell Infect Microbiol*. – 2019. – V. 9. – P. 241.

164. Kugeler, K. J. Molecular epidemiology of *Francisella tularensis* in the United States / K.J. Kugeler, P.S. Mead, A.M. Janusz, J.E. Staples, K.A. Kubota, L.G. Chalcraft, J.M. Petersen // *Clinical Infectious Diseases*. – 2009. – V. 48, N. 7. – P. 863-870. – doi: 10.1086/597261

165. Lagrange, B. Human caspase-4 detects tetra-acylated LPS and cytosolic *Francisella* and functions differently from murine caspase-11 // *Nat communications*. – 2018. – V. 9, N. 1. – P. 1-14.

166. Lai, X.H. Delineation of the molecular mechanisms of *Francisella tularensis*-induced apoptosis in murine macrophages / X.H. Lai, A. Sjöstedt // *Infect Immun*. – 2003. – V. 71, N. 8. – P. 4642-4646.

167. Lai, X.H. *Francisella tularensis* induces cytopathogenicity and apoptosis in murine macrophages via a mechanism that requires intracellular bacterial multiplication / X.H. Lai, I. Golovliov, A. Sjöstedt // *Infect Immun*. – 2001. – V. 69, N.7. – P.4691–4694.

168. Lambert, P.H. New vaccines against tuberculosis / P.H., Lambert, T. Hawkrigde, W.A. Hanekom // Clinics in chest medicine. – 2009. – V. 30, N. 4. – P. 811-826.
169. Lanzavecchia, A. Understanding the generation and function of memory T cell subsets / A. Lanzavecchia, F. Sallusto // Curr Opin Immunol. – 2005. – V. 17, N. 3. – P. 326-332.
170. Lavine, C.L. Immunization with heat-killed *Francisella tularensis* LVS elicits protective antibody-mediated immunity / C.L. Lavine, S.R. Clinton, I. Angelova-Fischer, T.N. Marion, X.R. Bina, J.E. Bina, M.A. Whitt, M.A. Miller // Eur J Immunol. – 2007. – V. 37, N. 11. – P. 3007–3020.
171. Le Pihive, E. Description of two new plasmids isolated from *Francisella philomiragia* strains and construction of shuttle vectors for the study of *Francisella tularensis* / E. Le Pihive, D. Blaha, S. Chenavas, F. Thibault, D. Vidal, E. Valade // Plasmid. – 2009. – V. 62. – P. 147-157.
172. Leiby, D. A. *In vivo* modulation of the murine immune response to *Francisella tularensis* LVS by administration of anticytokine antibodies / D.A. Leiby, A.H. Fortier, R.M. Crawford, R.D. Schreiber, C.A. Nacy // Infect Immun. – 1992. – V. 60, N. 1. – P. 84.
173. Lenhoff, H.M. Enzyme-mediated immunoassay. / H.M. Lenhoff, T.T. Ngo – Springer Science & Business Media, 2012. – 498 p.
174. Li, H. Innate immune response to *Francisella tularensis* is mediated by TLR2 and caspase-1 activation / H. Li, S. Nookala, X.R. Bina, J.E. Bina, F. Re // J Leukoc Biol. – 2006. – V. 80, N. 4. – P. 766-73.
175. Li, L. Identification of *M. tuberculosis*-specific Th1 cells expressing CD69 generated in vivo in pleural fluid cells from patients with tuberculous pleurisy / L. Li, D. Qiao, X. Fu, S. Lao, X. Zhang, C. Wu // PLoS One. – 2011. – V. 6, N. 8. – P. e23700.
176. Li, L. *Mycobacterium tuberculosis*-specific polyfunctional cytotoxic CD8⁺ T cells express CD69 / L. Li, B. Yang, X. Zhang, S. Lao, Wu Changyou // Tuberculosis (Edinb). – 2014. – V. 94, N. 3. – P. 219-225.

177. Liang, J. Enhanced and durable protective immune responses induced by a cocktail of recombinant BCG strains expressing antigens of multistage of *Mycobacterium tuberculosis* / J. Liang, X. Teng, X. Yuan, Y. Zhang, C. Shi, T. Yue, L. Zhou, J. Li, X. Fan // *Mol Immunol.* – 2015. – V. 66, N. 2. – P. 392-401.

178. Lin, Y. Interleukin-17 is required for T helper 1 cell immunity and host resistance to the intracellular pathogen *Francisella tularensis* / Y. Lin, S. Ritchea, A. Logar, S. Slight, M. Messmer, J. Rangel-Moreno, L. Gugliani, J.F. Alcorn, H. Strawbridge, S.M. Park, R. Onishi, N. Nyugen, M.J. Walter, D. Pociask, T.D. Randall, S.L. Gaffen, Y. Iwakura, J.K. Kolls, S.A. Khader // *Immunity.* – 2009. – V. 31, N. 5. – P. 799-810.

179. Lindenstrom, T. Tuberculosis subunit vaccination provides long-term protective immunity characterized by multifunctional CD4 memory T cells / T. Lindenstrøm, E.M. Agger, K.S. Korsholm, P.A. Darrah, C. Aagaard, R.A. Seder, I. Rosenkrands, P. Andersen // *J Immunol.* – 2009. – V. 182, N. 12. – P. 8047-55.

180. Lindgren, H. Distinct roles of reactive nitrogen and oxygen species to control infection with the facultative intracellular bacterium *Francisella tularensis* / H. Lindgren, S. Stenmark, W. Chen, A. Tärnvik, A. Sjöstedt // *Infect Immunity.* – 2004. – V. 72, N. 12. – P. 7172-7182.

181. Lindgren, H. The contribution of reactive nitrogen and oxygen species to the killing of *Francisella tularensis* LVS by murine macrophages / H. Lindgren, L. Stenman, A. Tarnvik, A. Sjostedt // *Microb Infect.* – 2005. – V. 7, N. 3. – P. 467-475.

182. Lindgren, H. Resistance of *Francisella tularensis* strains against reactive nitrogen and oxygen species with special reference to the role of KatG / H. Lindgren, H. Shen, C. Zingmark, I. Golovliov, W. Conlan, A. Sjöstedt // *Infect Immun.* – 2007. – V. 75, N. 3. – P. 1303–1309.

183. Lopez, M.C. Early activation of NK cells after lung infection with the intracellular bacterium, *Francisella tularensis* LVS / M.C. López, N.S. Duckett, S.D. Baron, D.W. Metzger // *Cell Immunol.* – 2004. – V. 232, N. (1-2). – P. 75-85.

184. Lu, Z. Generation and characterization of hybridoma antibodies for immunotherapy of tularemia / Z. Lu, M.I. Roche, J.H. Hui, B. Unal, P.L. Felgner, S. Gulati, G. Madico, J. Sharon // *Immunol Lett.* – 2007. – V. 112, N. 2. – P. 92-103.
185. Lund, F.E. Effector and regulatory B cells: modulators of CD4⁺ T cell immunity / F.E. Lund, T.D. Randall // *Nat Rev. Immunology.* – 2010. – V. 10, N. 4. – P. 236-47.
186. Maeshima, N. Recognition of lipid A variants by the TLR4-MD-2 receptor complex / N. Maeshima, R.C. Fernandez // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2013. – V. 12, N. 3. – P. 3.
187. Majlessi, L. An increase in antimycobacterial Th1-cell responses by prime-boost protocols of immunization does not enhance protection against tuberculosis / L. Majlessi, M. Simsova, Z. Jarvis, P. Brodin, M.J. Rojas, C. Bauche, C. Leclerc // *Infect Immun.* – 2006. – V. 74, N. 4. – P. 2128-2137.
188. Malik, M. Matrix metalloproteinase 9 activity enhances host susceptibility to pulmonary infection with type A and B strains of *Francisella tularensis* / M. Malik, C.S. Bakshi, K. McCabe, S.V. Catlett, A. Shah, R. Singh, P.L. Jackson, A. Gaggar, D.W. Metzger, J.A. Melendez, J.E. Blalock, T.J. Sellati // *J Immunol.* – 2007. – V. 15, N. 178(2). – P. 1013-1020.
189. Malik, M. Toll-like receptor 2 is required for control of pulmonary infection with *Francisella tularensis* / M. Malik, C.S. Bakshi, B. Sahay, A. Shah, S.A. Lotz, T.J. Sellati // *Infect Immun.* – 2006. – V. 74, N. 6. – P. 3657-62.
190. Man, S.M. AIM2 inflammasome in infection, cancer, and autoimmunity: role in DNA sensing, inflammation, and innate immunity / S.M. Man, R. Karki, T.D. Kanneganti // *Eur J Immunol.* – 2016. – V. 46, N. 2. – P. 269-280.
191. Mara-Koosham, G. Antibodies contribute to effective vaccination against respiratory infection by type A *Francisella tularensis* strains / G. Mara-Koosham, J.A. Hutt, C.R. Lyons, T.H. Wu // *Infect Immun.* – 2011. – V. 79, N. 4. – 1770-1778.
192. Marín, N.D. The role of CD30 and CD153 (CD30L) in the anti-mycobacterial immune response / N.D. Marín, L.F. García // *Tuberculosis (Edinb).* – 2017. – V. 102. – P. 8-15.

193. Markel, G. The involvement of IL-17A in the murine response to sub-lethal inhalational infection with *Francisella tularensis* / G. Markel, E. Bar-Haim, E. Zahavy, H. Cohen, O. Cohen, A. Shafferman, B. Velan // PLoS One. – 2010. – V. 5, N. 6. – P. e11176.
194. McCaffrey, R.L. *Francisella tularensis* LVS evades killing by human neutrophils via inhibition of the respiratory burst and phagosome escape / R.L. McCaffrey, L.A. Allen // J Leukoc Biol. – 2006. – V. 80, N. 6. – P. 1224-30.
195. McCaffrey, R.L. Multiple mechanisms of NADPH oxidase inhibition by type A and type B *Francisella tularensis* / R.L. McCaffrey, J.T. Schwartz, S.R. Lindemann, J.G. Moreland, B.W. Buchan, B.D. Jones, L.A. Allen // J Leukoc Biol. – 2010. – V. 88, N. 4. – P. 791-805.
196. Meibom, K.L., Charbit A. *Francisella tularensis* metabolism and its relation to virulence / K.L. Meibom, A. Charbit // Front Microbiol. – 2010. – V. 1. – P. 140.
197. Meierovics, A. MAIT cells are critical for optimal mucosal immune responses during *in vivo* pulmonary bacterial infection / A. Meierovics, W.J. Yankelevich, S.C. Cowley // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2013. – V. 110, N. 33. – P. E3119-E3128.
198. Meierovics, A.I. MAIT cells promote inflammatory monocyte differentiation into dendritic cells during pulmonary intracellular infection / A.I. Meierovics, S.C. Cowley // J Exp Med. – 2016. – V. 213, N. 12. – P. 2793-2809.
199. Melillo, A.A. Identification of *Francisella tularensis* live vaccine strain CuZn superoxide dismutase as critical for resistance to extracellularly generated reactive oxygen species / A.A. Melillo, M. Mahawar, T.J. Sellati, M. Malik, D.W. Metzger, J.A. Melendez, C.S. Bakshi // J Bacteriol. – 2009. – V. 191, N. 20. – P. 6447–6456.
200. Metzger, D.W. Mucosal immunopathogenesis of *Francisella tularensis* / D.W. Metzger, C.S. Bakshi, G. Kirimanjeswara // Ann N Y Acad Sci. – 2007. – V. 1105. – P. 266-283.
201. Meunier, E. Guanylate-binding proteins promote activation of the AIM2 inflammasome during infection with *Francisella novicida* / E. Meunier, P. Wallet, R.F. Dreier, S. Costanzo, L. Anton, S. Rühl, S. Dussurgey, M.S. Dick, A. Kistner, M. Rigard,

D. Degrandi, K. Pfeffer, M. Yamamoto, T. Henry, P. Broz // Nat Immunol. – 2015. – V. 16, N. 5. – P. 476-484.

202. Michell, S.L. Deletion of the *Bacillus anthracis capB* homologue in *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* generates an attenuated strain that protects mice against virulent tularemia / S.L. Michell, R.E. Dean, J.E. Eyles, M.G. Hartley, E. Waters, J.L. Prior, P.C. Oyston // J Med Microbiol. – 2010. – V. 59, N. 11. – P. 1275-1284.

203. Miki-Hosokawa, T. CD69 controls the pathogenesis of allergic airway inflammation / T. Miki-Hosokawa, A. Hasegawa, C. Iwamura, K. Shinoda, S. Tofukuji, Y. Watanabe, H. Hosokawa, S. Motohashi, K. Hashimoto, M. Shirai, M. Yamashita, T. Nakayama // J Immunol. – 2009. – V. 183, N. 12. – P. 8203-8215.

204. Moliva, J.I. Immune responses to *Bacillus Calmette-Guérin* vaccination: why do they fail to protect against *Mycobacterium tuberculosis*? / J.I. Moliva, J. Turner, J.B. Torrelles // Front Microbiol. – 2017. – V. 8. – P. 407.

205. Nano, F.E. A *Francisella tularensis* pathogenicity island required for intramacrophage growth / F.E. Nano, N. Zhang, S.C. Cowley, K.E. Klose, K.K. Cheung, M.J. Roberts, J.S. Ludu, G.W. Letendre, A.I. Meierovics, G. Stephens, K.L. Elkins // J Bacteriol. – 2004. – V. 186, N. 19. – P. 6430–6436.

206. Nano, F.E. The *Francisella* pathogenicity island / F.E. Nano, C. Schmerk // Ann N Y Acad Sci. – 2007. – V. 1105, N 1. – P. 122-137.

207. Nicol, M.J. Differential immune response following intranasal and intradermal infection with *Francisella tularensis*: implications for vaccine development / M.J. Nicol, D.R. Williamson, D.E. Place, G.S. Kirimanjeswara, // Microorganisms. – 2021. – V. 9, N. 5. – P. 973.

208. Nutter, J.E. Effect of vaccine, route, and schedule on antibody response of rabbits to *Pasteurella tularensis* / J.E. Nutter // Appl microbiol. – 1969. – V. 17, N. 3. – P. 355–359.

209. Okan, N.A. The atypical lipopolysaccharide of *Francisella* / N.A. Okan, D.L. Kasper // Carbohydr Res. – 2013. – V. 30, N. 378. – P. 79-83.

210. Olsufjev, N.G. Taxonomy and characteristic of the genus *Francisella* Dorofeev, 1947 / N.G. Olsufjev // Journal of hygiene, epidemiology, microbiology, and immunology. – 1970. – V. 14, N. 1. – P. 67-74.

211. O'Neill, L.A. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity / L.A. O'Neill, D. Golenbock, A.G. Bowie // Nat Rev. Immunol. – 2013. – V. 13, N. 6. – P. 453-60.

212. Pammit, M.A. Intranasal vaccination with a defined attenuated *Francisella novicida* strain induces gamma interferon-dependent antibody-mediated protection against tularemia / M.A. Pammit, E.K. Raulie, C.M. Lauriano, K.E. Klose, BP. Arulanandam // Infect Immun. – 2006. – V. 74, N. 4. – P. 2063.

213. Paravitana, C. Th17 cytokines in recall responses against *Francisella tularensis* in humans / C. Paravitana, E. Zelazowska, L. DaSilva, P.R. Pittman, M. Nikolich // J Interferon Cytokine Res. – 2010. – V. 30, N. 7. – P. 471-476.

214. Petersen, J.M. Subpopulations of *Francisella tularensis* ssp. *tularensis* and *holarctica*: identification and associated epidemiology / J.M. Petersen, C.R. Molins // Future Microbiol. – 2010. – V. 5, N. 4. – P. 649-661.

215. Pierini, L.M. Uptake of serum-opsonized *Francisella tularensis* by macrophages can be mediated by class A scavenger receptors / L.M. Pierini // Cell Microbiol. – 2006. – V. 8, N. 8. – P. 1361-1370.

216. Pilo, P. Phylogenetic lineages of *Francisella tularensis* in animals / P. Pilo // Front Cell Infect Microbiol. – 2018. – V. 8. – P. 258.

217. Plzakova, L. Entry of *Francisella tularensis* into murine B cells: The role of B cell receptors and complement receptors / L. Plzakova, Z. Krocova, K. Kubelkova, A. Macela // PLoS One. – 2015. – V. 10, N. 7. – P. e0132571.

218. Polsinelli, T. Nitric oxide-independent killing of *Francisella tularensis* by IFN-gamma-stimulated murine alveolar macrophages / T. Polsinelli, M.S. Meltzer, A.H. Fortier // J Immunol. – 1994. – V. 153, N. 3. – P. 1238–1245.

219. Poquet, Y. Expansion of V γ 9V δ 2 T cells is triggered by *Francisella tularensis*-derived phosphoantigens in tularemia but not after tularemia vaccination / Y.

Poquet, M. Kroca, F. Halary, S. Stenmark, M.A. Peyrat, M. Bonneville, J.J. Fournié, A. Sjöstedt // *Infect Immun.* – 1998. – V. 66, N. 5. – P. 2107.

220. Pulavendran, S. Production of neutrophil extracellular traps contributes to the pathogenesis of *Francisella tularemia* / S. Pulavendran, M. Prasanthi, A. Ramachandran, R. Grant, T. A. Snider, V. Chow, J. R. Malayer, N. Teluguakula // *Front Immunol.* – 2020. – V. 11. – P. 679.

221. Pulendran, B. Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development / B. Pulendran, R. Ahmed // *Cell.* – 2006. – V. 124, N. 4. – P. 849-863.

222. Raetz, CR. Biochemistry of endotoxins / C.R. Raetz // *Ann Rev Biochem.* – 1990. – V. 59, N. 1. – P. 129-170.

223. Rajaram, M.V. Akt and SHIP modulate *Francisella* escape from the phagosome and induction of the Fas-mediated death pathway / M.V. Rajaram, J.P. Butchar, K.V. Parsa, T.J. Cremer, A. Amer, L.S. Schlesinger, S. Tridandapani // *PLoS ONE.* – 2009. – V. 4, N. 11. – P. e7919.

224. Rawool, D.B. Utilization of Fc receptors as a mucosal vaccine strategy against an intracellular bacterium, *Francisella tularensis* / D.B. Rawool, C. Bitsaktsis, Y. Li, D.R. Gosselin, Y. Lin, N.V. Kurkure, D.W. Metzger, E.J. Gosselin // *J Immunol.* – 2008. – V. 180, N. 8. – P. 5548-5557.

225. Rhinehart-Jones, T.R. Transfer of immunity against lethal murine *Francisella* infection by specific antibody depends on host gamma interferon and T cells / T.R. Rhinehart-Jones, A.H. Fortier, K.L. Elkins // *Infect Immun.* – 1994. – V. 62, N. 8. – P. 3129.

226. Roberts, L.M. Adaptive immunity to *Francisella tularensis* and considerations for vaccine development / L.M. Roberts, D.A. Powell, J.A. Frelinger // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2018. – V. 8. – P. 115.

227. Roberts, L.M. IFN-gamma, but not IL-17A, is required for survival during secondary pulmonary *Francisella tularensis* live vaccine strain infection / L.M. Roberts, J.S. Davies, G.D. Sempowski, J.A. Frelinger // *Vaccine.* – 2014. – V. 32, N. 29. – P. 3595–3603.

228. Roberts, L.M. Inclusion of epitopes that expand high avidity CD4⁺ T Cells transforms subprotective vaccines to efficacious immunogens against virulent *Francisella tularensis* / L.M. Roberts, D.D. Crane, T.D. Wehrly, J.R. Fletcher, B.D. Jones, C.M. Bosio // J Immunol. – 2016. – V. 197, N. 7. – P. 2738-47.
229. Rodriguez, A.R. Mast cell/IL-4 control of *Francisella tularensis* replication and host cell death is associated with increased ATP production and phagosomal acidification / A.R. Rodriguez, J.J. Yu, A.K. Murthy, M.N. Guentzel, K.E. Klose, T.G. Forsthuber, J.P. Chambers, M.T. Berton, B.P. Arulanandam // Mucosal Immunol. – 2011. – V. 4, N. 2. – P. 217-226.
230. Rohmer, L. Potential source of *Francisella tularensis* live vaccine strain attenuation determined by genome comparison / L. Rohmer, M. Brittnacher, K. Svensson, D. Buckley, E. Haugen, Y. Zhou, M. Olson // Infect Immun. – 2006. – V. 74, N. 12. – P. 6895-6906.
231. Rosa, D.S. A DNA vaccine encoding multiple HIV CD4 epitopes elicits vigorous polyfunctional, long-lived CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses / D.S. Rosa, S.P. Ribeiro, R.R. Almeida, E.C. Mairena, E. Postol, J. Kalil, E. Cunha-Neto // PloS one. – 2011. – V. 6, N. 2. – P. e16921.
232. Rowe, H.M. From the outside in: the *Francisella tularensis* envelope and virulence / H.M. Rowe, J.F. Huntley // Front Cell Infect Microbiol. – 2015. – V. 5. – P. 94.
233. Rowland, C.A. Peripheral human $\gamma\delta$ T cells control growth of both avirulent and highly virulent strains of *Francisella tularensis* *in vitro* / C.A. Rowland, M.G. Hartley, H. Flick-Smith, T.R. Laws, J.E. Eyles, P.C. Oyston // Microbes Infect. – 2012. – V. 14, N. 7-8. – P. 584-589.
234. Russo, B.C. MyD88-dependent signaling prolongs survival and reduces bacterial burden during pulmonary infection with virulent *Francisella tularensis* / B.C. Russo, M.J. Brown, G.J. Nau // Am J Pathol. – 2013. – V. 183, N. 4. – P. 1223-1232.
235. Salerno-Gonçalves, R. Generation of heterogeneous memory T cells by live attenuated tularemia vaccine in humans / R. Salerno-Gonçalves, M.J. Hepburn, S. Bavari, M.B. Sztein // Vaccine. – 2009. – V. 28, N. 1. – P. 195-206.

236. Sallusto, F. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance / F. Sallusto, J. Geginat, A. Lanzavecchia // *Ann Rev Immunol.* – 2004. – V. 22. – P. 745-63.
237. Sanapala, S. Perforin- and granzyme-mediated cytotoxic effector functions are essential for protection against *Francisella tularensis* following vaccination by the defined *F. tularensis* subsp. *novicida* Δ fopC vaccine strain / S. Sanapala, J.J. Yu, A.K. Murthy, W. Li, M.N. Guentzel, J.P. Chambers, K.E. Klose, B.P. Arulanandam // *Infect Immun.* – 2012. – V. 80, N. 6. – P. 2177-2185.
238. Sandström, G. Immunogenicity and toxicity of lipopolysaccharide from *Francisella tularensis* LVS / G. Sandström, A. Sjöstedt, T. Johansson, K. Kuoppa, J.C. Williams // *FEMS Microbiol. Immunol.* – 1992. – V. 5. – P. 201–210.
239. Santic, M. Acquisition of the vacuolar ATPase proton pump and phagosome acidification are essential for escape of *Francisella tularensis* into the macrophage cytosol / M. Santic, R. Asare, I. Skrobonja, S. Jones, Y. Abu Kwaik // *Infect Immun.* – 2008. – V. 76, N. 6. – P. 2671-2677.
240. Santic, M. Modulation of biogenesis of the *Francisella tularensis* subsp. *novicida*-containing phagosome in quiescent human macrophages and its maturation into a phagolysosome upon activation by IFN-gamma / M. Santic, M. Molmeret, Y. Abu Kwaik // *Cellular microbiology.* – 2005. – V. 7, N. 7. – P. 957-967.
241. Santic, M. The *Francisella tularensis* pathogenicity island protein IglC and its regulator MglA are essential for modulating phagosome biogenesis and subsequent bacterial escape into the cytoplasm / M. Santic, M. Molmeret, K.E. Klose, S. Jones, Y.A. Kwaik // *Cell Microbiol.* – 2005. – V. 7, N. 7. P. 969–979.
242. Saslaw, S. Tularemia vaccine study: I. Intracutaneous challenge / S. Saslaw, H.T. Eigelsbach, H.E. Wilson, J.A. Prior, S. CARHART // *Arch Intern Med.* – 1961. – V. 107, N. 5. – P. 689-701.
243. Saslaw, S. Tularemia vaccine study: II. Respiratory challenge / S. Saslaw, H.T. Eigelsbach, J.A. Prior, H.E. Wilson, S. Carhart // *Arch Intern Med.* – 1961. – V. 107, N. 5. – P. 702-714.

244. Scheller, L.F. Maintenance of protective immunity against malaria by persistent hepatic parasites derived from irradiated sporozoites / L.F. Scheller, A.F. Azad // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1995. – V. 92, N. 9. – P. 4066-4068.
245. Schulert, G.S. Differential infection of mononuclear phagocytes by *Francisella tularensis*: role of the macrophage mannose receptor / G.S. Schulert, L.A. Allen // J Leukoc Biol. – 2006. – V. 80, N. 3. – P. 563-571.
246. Sebastian, S. A defined O-antigen polysaccharide mutant of *Francisella tularensis* live vaccine strain has attenuated virulence while retaining its protective capacity / S. Sebastian, S.T. Dillon, J.G. Lynch, L.T. Blalock, E. Balon, K.T. Lee, L.E. Comstock, J.W. Conlan, E.J. Rubin, A.O. Tzianabos, D.L. Kasper // Infect Immun. – 2007. – V. 75, N. 5. – P. 2591-2602.
247. Sebastian, S. Cellular and humoral immunity are synergistic in protection against types A and B *Francisella tularensis* / S. Sebastian, J.T. Pinkham, J.G. Lynch, R.A. Ross, B. Reinap, L.T. Blalock, J.W. Conlan, D.L. Kasper // Vaccine. – 2009. – V. 27, N. 4. – P. 597-605.
248. Seder, R.A. Similarities and differences in CD4⁺ and CD8⁺ effector and memory T cell generation / R.A. Seder, R. Ahmed // Nat Immunol. – 2003. – V. 4, N. 9. – P. 835-842.
249. Seder, R.A. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design / R.A. Seder, P.A. Darrah, M. Roederer // Nat Rev. Immunol. – 2008. – V. 8, N. 4. – P. 247-258.
250. Seder, R.A. Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity / R.A. Seder, A.V. Hill // Nature. – 2000. – V. 406, N. 6797. – P. 793-798.
251. Sjöstedt, A. Neutrophils are critical for host defense against primary infection with the facultative intracellular bacterium *Francisella tularensis* in mice and participate in defense against reinfection / A. Sjöstedt, J.W. Conlan, R.J. North // Infect Immun. – 1994. – V. 62, N. 7. – P. 2779-2783.
252. Sjöstedt, A. Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations / A. Sjöstedt // Ann N Y Acad Sci. – 2007. – V. 1105, N. 1. – P. 1-29.

253. Sjöstedt, A. The requirement of tumour necrosis factor- α and interferon- γ for the expression of protective immunity to secondary murine tularemia depends on the size of the challenge inoculum / A. Sjöstedt, R.J. North, J.W. Conlan // Microbiology. – 1996. – V. 142, N. 6. – P. 1369-1374.
254. Skyberg, J.A. Interleukin-17 protects against the *Francisella tularensis* live vaccine strain but not against a virulent *F. tularensis* type A strain / J.A. Skyberg, M.F. Rollins, J.W. Samuel, M.D. Sutherland, J.T. Belisle, D.W. Pascual // Infect Immun. – 2013. – V. 81, N. 9. – P. 3099-30105.
255. Smulevich, G. Probing the structure and bifunctionality of catalase-peroxidase (KatG) / G. Smulevich, C. Jakopitsch, E. Droghetti, C. Obinger // J Inorg Biochem. – 2006. – V. 100, N. 4. – P. 568–585.
256. Steiner, D.J. Detrimental influence of alveolar macrophages on protective humoral immunity during *Francisella tularensis* SchuS4 pulmonary infection / D.J. Steiner, Y. Furuya, D.W. Metzger // Infect Immun. – 2018. – V. 86, N. 4. – P. e00787-17.
257. Steiner, D.J. Protective role for macrophages in respiratory *Francisella tularensis* infection / D.J. Steiner, Y. Furuya, M.B. Jordan, D.W. Metzger // Infect Immun. – 2017. – V. 85, N. 6. – P. e00064-17.
258. Stenmark, S. Specific antibodies contribute to the host protection against strains of *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* / S. Stenmark, H. Lindgren, A. Tärnvik, A. Sjöstedt // Microbial Pathog. – 2003. – V. 35, N. 2. – P. 73-80.
259. Stubbe, M. Antigen-specific central memory CD4 / M. Stubbe, N. Vanderheyde, M. Goldman, A. Marchant // J Immunol (Baltimore, Md.: 1950). – 2006. – V. 177. – P. 8185-8190.
260. Sunagar, R. Tularemia vaccine development: paralysis or progress? / R. Sunagar, S. Kumar, B.J. Franz, E.J. Gosselin // Vaccine (Auckl). – 2016. – V. 6. – P. 9-23.
261. Telepnev, M. *Francisella tularensis* inhibits Toll-like receptor-mediated activation of intracellular signalling and secretion of TNF- α and IL-1 from murine

macrophages / M. Telepnev, I. Golovliov, T. Grundström, A. Tärnvik, A. Sjöstedt // *Cell Microbiol.* – 2003. – V.5, N. 1. – P. 41-51.

262. Thakur, A. Intracellular Pathogens: host immunity and microbial persistence strategies / A. Thakur, H. Mikkelsen, G. Jungersen // *J Immunol Res.* – 2019. – V. 2019. – P. 1356540.

263. Thakur, A. Immune markers and correlates of protection for vaccine induced immune responses / A. Thakur, L.E. Pedersen, G. Jungersen // *Vaccine.* – 2012. – V. 30, N. 33. – P. 4907-4920.

264. Thakur, A.L. B cell subsets are activated and produce cytokines during early phases of *Francisella tularensis* LVS infection / A.L. Thakur, L. Plzakova, K. Kubelkova, Z. Krocova, L. Zarybnicka, Z. Sinkorova, A. Macela // *Microbial Pathog.* – 2014. – V. 75. – P. 49–58.

265. Thomas, R.M. The immunologically distinct O antigens from *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* and *Francisella novicida* are both virulence determinants and protective antigens / R.M. Thomas, R.W. Titball, P.C. Oyston, K. Griffin, E. Waters, P.G. Hitchen, S.L. Michell, I.D. Grice, J.C. Wilson, J. L. Prior // *Infect Immun.* – 2007. – V. 75. – N. 1. – P. 371.

266. Timofeev, V. The comparative virulence of *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* for vaccinated laboratory animals / V. Timofeev, G. Titareva, I. Bahtejeva, T. Kombarova, T. Kravchenko, A. Mokrievich, I. Dyatlov // *Microorganisms.* – 2020. – V. 8, N. 9. – P. 1403.

267. Twine, S.M. *In vivo* proteomic analysis of the intracellular bacterial pathogen, *Francisella tularensis*, isolated from mouse spleen / S.M. Twine, N.C. Mykytczuk, M.D. Petit // *Biochemical and biophysical research communications.* – 2006. - V. 345. – P. 1621-633.

268. Ulland, T.K. *Francisella tularensis* live vaccine strain folate metabolism and pseudouridine synthase gene mutants modulate macrophage caspase-1 activation / T.K. Ulland, A.M. Janowski, B.W. Buchan, M. Faron, S.L. Cassel, B.D. Jones, F.S. Sutterwala // *Infect Immun.* – 2013. – V. 81, N. 1. – P. 201-208.

269. Uzonna, J.E. Immune elimination of *Leishmania major* in mice: implications for immune memory, vaccination, and reactivation disease / J.E. Uzonna, G. Wei, D. Yurkowski, P. Bretscher // J Immunol. – 2001. – V. 167, N. 12. – P. 6967-6974.
270. Vascotto, F. Antigen presentation by B lymphocytes: how receptor signaling directs membrane trafficking / F. Vascotto, D. Le Roux, D. Lankar, G. Faure-André, P. Vargas, P. Guernonprez, A.M. Lennon-Duménil // Curr Opin Immunol. – 2007. – V. 19, N. 1. – P. 93-98.
271. Vega-Ramos, J. CD69 limits early inflammatory diseases associated with immune response to *Listeria monocytogenes* infection / J. Vega-Ramos, E. Alaripahissa, J.D. Valle, E. Carrasco-Marín, E. Esplugues, M. Borràs, C. Martínez-A, P. Lauzurica // Immunol Cell Biol. – 2010. – V. 88, N. 7. – P. 707-715.
272. Wallet, P. *Francisella* inflammasomes: integrated responses to a cytosolic stealth bacterium / P. Wallet, B. Lagrange, T. Henry // Curr Top Microbiol Immunol. – 2016. – P. 229-256.
273. Warner, N. MyD88: a critical adaptor protein in innate immunity signal transduction / N. Warner, G. Núñez // J Immunol. – 2013. – V. 1, N. 190(1). – P. 3-4.
274. Wickstrum, J.R. *Francisella tularensis* induces extensive caspase-3 activation and apoptotic cell death in the tissues of infected mice / J.R. Wickstrum, S.M. Bokhari, J.L. Fischer, D.M. Pinson, H.W. Yeh, R.T. Horvat, M.J. Parmely // Infect Immun. – V. 77, N. 11. – P. 4827–4836.
275. Williamson, D. Approaches to modelling the human immune response in transition of candidates from research to development / D. Williamson // J Immunol Res. – 2014. – V. 2014 – P. 395302.
276. Williamson, E.D. Predictive models and correlates of protection for testing biodefence vaccines / E.D. Williamson, M.G. Duchars, R. Kohberger // Exp Rev. Vacc. – 2010. – V. 9, N. 5. – P. 527-537.
277. Wojciechowski, W. Cytokine-producing effector B cells regulate type 2 immunity to *H. polygyrus*. / W. Wojciechowski, D.P. Harris, F. Sprague, B. Mousseau, M. Makris, K. Kusser, T. Honjo, K. Mohrs, M. Mohrs, T. Randall, F.E. Lund // Immunity. – 2009. – V. 30, N. 3. – P. 421-433.

278. Woolard, M.D. Identification of *Francisella novicida* mutants that fail to induce prostaglandin E(2) synthesis by infected macrophages / M.D. Woolard, L.M. Barrigan, J.R. Fuller, A.S. Buntzman, J. Bryan, C. Manoil, T.H. Kawula, J.A. Frelinger // *Front Microbiol.* – 2013. – V. 4. P. 16.

279. Woolard, M.D. Respiratory *Francisella tularensis* live vaccine strain infection induces Th17 cells and prostaglandin E2, which inhibits generation of gamma interferon-positive T cells / M.D. Woolard, L.L. Hensley, T.H. Kawula, J.A. Frelinger // *Infect Immun.* – 2008. – V. 76, N. 6. – P. 2651-9.

280. Wu, T.H. Intranasal vaccination induces protective immunity against intranasal infection with virulent *Francisella tularensis* biovar A / T.H. Wu, J.A. Hutt, K.A. Garrison, L.S. Berliba, Y. Zhou, C.R. Lyons // *Infect Immun.* – 2005. – V. 73, N. 5. – P. 2644-2654.

281. Yanaba, K. A regulatory B cell subset with a unique CD1d^{hi}CD5⁺ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses / K. Yanaba, J.D. Bouaziz, K.M. Haas, J.C. Poe, M. Fujimoto, T.F. Tedder // *Immunity.* – 2008. – V. 28, N. 5. – P. 639-50.

282. Yee, D. Loss of either CD4⁺ or CD8⁺ T cells does not affect the magnitude of protective immunity to an intracellular pathogen, *Francisella tularensis* strain LVS / D. Yee, T.R. Rhinehart-Jones, K.L. Elkins // *J Immunol.* – 1996. – V. 157, N. 11. – P. 5042-5048.

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 // Материалы II Национального конгресса бактериологов. 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 // Материалы II Всероссийской научно-практической конференции «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 // The 7th Congress of European Microbiologists (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 подвигов / А.С. Пинчук, Т.И. Комбарова, Т.Б. Кравченко, В.С. Тимофеев, И.В. Бахтеева, А.Н. Мокриевич, В.В. Фирстова // Материалы IV Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным 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 // Материалы IV Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным 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 // Статья в сборнике трудов конференции – «Проблемы медицинской микологии» сборник трудов XXI Кашкинские чтения. 6-8 июня 2018 г. – 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 // Материалы XI Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным 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 // Статья в сборнике трудов конференции – «Проблемы медицинской микологии» сборник трудов XXII Кашкинские чтения. 12-15 июня 2019 г – 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 // Материалы 7-й Международной конференции «Ситуационные центры и информационно-аналитические системы для задач мониторинга и безопасности (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 // Статья в сборнике трудов конференции – «Проблемы медицинской микологии» сборник трудов XXIII Кашкинские чтения. 9-11 июня 2020 г. – 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 // Статья в сборнике трудов конференции – «Проблемы медицинской микологии» сборник трудов XXIII Кашкинские чтения. 9-11 июня 2020 г. – с. 126.

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

ПРИЛОЖЕНИЕ

Свидетельство о регистрации Базы данных: «Показатели противотуляремийного иммунитета на модели мышей линии BALB/c»

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



СВИДЕТЕЛЬСТВО
о государственной регистрации базы данных

№ 2020621186

«Показатели противотуляремийного иммунитета на модели мышей линии BALB/c»

Правообладатель: *Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ГНЦ ПМБ) (RU)*

Авторы: *Карцева Алена Сергеевна (RU), Силкина Марина Владимировна (RU), Говорунов Игорь Геннадиевич (RU), Фирстова Виктория Валерьевна (RU), Калмантаева Ольга Валериевна (RU)*

Заявка № **2020621033**
Дата поступления **03 июля 2020 г.**
Дата государственной регистрации
в Реестре баз данных **10 июля 2020 г.**

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности



Г.П. Ивлиев Г.П. Ивлиев