

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2025

Карцева А.С., Силкина М.В., Рябко А.К., Иващенко Т.А., Романенко Я.О., Фирстова В.В.

## ОЦЕНКА НАПРЯЖЕННОСТИ И ДЛИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОЧНОГО И ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА У ЛЮДЕЙ ПОСЛЕ ИММУНИЗАЦИИ ЖИВОЙ ТУЛЯРЕМИЙНОЙ ВАКЦИНОЙ

ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора, 142279, Серпухов, Оболенск, Россия



<https://elibrary.ru/xsqkxl>

*Современная иммунопрофилактика инфекционных болезней сосредоточена на совершенствовании методов оценки длительности иммунитета и разработке персонализированного подхода к вакцинации.*

**Цель работы** – анализ напряженности гуморального и клеточного иммунитета у людей после иммунизации живой туляремийной вакциной (ЖТВ) для идентификации методов оценки противотуляремийного иммунитета и разработки персонализированных подходов к вакцинации на основе выявленных иммунологических показателей.

**Материал и методы.** Оценка напряженности и длительности иммунитета была проведена через 5 лет после иммунизации ЖТВ. Титры специфических IgG антител к липополисахариду (ЛПС) *F. tularensis* в сыворотках крови людей определяли методом ИФА. Функциональную активность мононуклеарных клеток (МНК) определяли в экспериментах *in vitro*, стимулируя клетки туляремийным антигеном и оценивая их пролиферативный потенциал и цитокин-продуцирующую активность.

**Результаты.** Антиген-индукцированная стимуляция лимфоцитов вакцинированных доноров сопровождалась усилением пролиферации субпопуляций Т- и В-клеток. Анализ цитокинов показал статистически значимое повышение уровней ряда хемокинов (*SDF-1α*, *IP-10*, *IL-8*, *MIP-1β* и *MCP-1*), провоспалительных цитокинов (*IL-1α*, *IL-1β*, *IL-18*, *IL-6*) и противовоспалительных цитокинов (*IL-10*, *IL-1RA*, *IL-27*, *IL-22*) у вакцинированных доноров при антигенный стимуляции клеток. Определена Т-хелперная направленность иммунного ответа и выявлено, что у вакцинированных доноров иммунный ответ поляризован по смешанному *Th1/Th2/Th17*-типу. Показано, что у 83,3 % вакцинированных доноров сохраняются специфические антитела к ЛПС *F. tularensis* в диагностически значимом титре ( $\geq 1:400$ ).

**Заключение.** В качестве критерии оценки поствакцинального иммунитета предложено использовать уровень специфических антител к ЛПС *F. tularensis* ( $\geq 1:400$ ) и антиген-индукцированную пролиферацию лимфоцитов. Полученные данные обосновывают возможность перехода к персонализированной схеме ревакцинации с увеличением интервалов при условии контроля гуморального и клеточного иммунитета, что позволит снизить число инъекций и затраты на вакцинацию без потери профилактической эффективности.

**Ключевые слова:** противотуляремийный иммунитет; вакциновый штамм; *Francisella tularensis*; клетки памяти

**Для цитирования:** Карцева А.С., Силкина М.В., Рябко А.К., Иващенко Т.А., Романенко Я.О., Фирстова В.В. Оценка напряженности и длительности клеточного и гуморального иммунитета у людей после вакцинации живой туляремийной вакциной. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2025; 30; 4: 244-251.

DOI: <https://doi.org/10.51620/3034-1981-2025-30-4-244-251>

EDN: XSQKXL

**Для корреспонденции:** Карцева Алена Сергеевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, п. Оболенск, Московская область, Россия, e-mail: kartseva@obolensk.org

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках Отраслевой программы Роспотребнадзора.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 07.09.2025

Принята к печати 13.11.2025

Kartseva A.S., Silkina M.V., Riabko A.K., Ivashchenko T.A., Romanenko Ya.O., Firstova V.V.

## EVALUATION OF THE INTENSITY AND LONG-TERM CELLULAR AND HUMORAL IMMUNITY IN HUMANS AFTER IMMUNIZATION WITH A LIVE TULAREMIA VACCINE

Federal Budgetary Scientific Institution «State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology» of Rospotrebnadzor, 142279, Obolensk, Russia

*Current immunoprophylaxis of infectious diseases focuses on improving methods for assessing the duration of immunity and developing a personalized approach to vaccination.*

**The aim of the work** is to analyze the intensity of humoral and cellular immunity in people after after immunization with live tularemia vaccine (LTV) to identify methods for assessing anti-tularemia immunity and to develop personalized approaches to vaccination based on the identified immunological parameters.

**Materials and methods.** The assessment of the intensity and duration of immunity was carried out 5 years after immunization with LTV. The titers of specific IgG antibodies to *F. tularensis* lipopolysaccharide (LPS) in human blood serum were determined by ELISA. The functional activity of mononuclear cells (PBMCs) was determined in *in vitro* experiments by stimulating cells with tularemia antigen and evaluating their proliferative potential and cytokine-producing activity.

**Results.** Antigen-induced stimulation of the lymphocytes of vaccinated donors was accompanied by increased proliferation of T- and B-cell subpopulations. Cytokine analysis showed a statistically significant increase in the levels of a number of chemokines (*SDF-1α*, *IP-10*, *IL-8*, *MIP-1β* and *MCP-1*), pro-inflammatory cytokines (*IL-1α*, *IL-1β*, *IL-18*, *IL-6*) and anti-inflammatory cytokines (*IL-10*, *IL-1RA*, *IL-27*, *IL-22*) in vaccinated donors with antigenic stimulation of cells. The T-helper orientation of the immune response was determined and it was revealed that in vaccinated donors, the immune response is polarized according to a mixed *Th1/Th2/Th17* type. It was shown that 83.3% of vaccinated donors retain specific antibodies to *F. tularensis* LPS in a diagnostically significant titer ( $\geq 1:400$ ).

**Conclusion.** It is proposed to use the level of specific antibodies to *F. tularensis* LPS ( $\geq 1:400$ ) and antigen-induced lymphocyte proliferation as criteria for assessing post-vaccination immunity. The data obtained substantiate the possibility of switching to a personalized revaccination regimen with increased intervals, subject to control of humoral and cellular immunity, which will reduce the number of injections and the cost of vaccination without loss of preventive effectiveness.

**Key words:** Anti-tularemia immunity; vaccine strain; *Francisella tularensis*; memory cells

**For citation:** Kartseva A.S., Silkina M.V., Riabko A.K., Ivashchenko T.A., Romanenko Ya.O., Firstova V.V. Evaluation of the intensity and long-term cellular and humoral immunity in humans after immunization with a live tularemia vaccine. *Epidemiologiya I Infektsionnye bolezni (Epidemiology and infectious diseases)*. 2025; 30; 4: 244-251. (in Rus.)  
DOI: https://doi.org/10.51620/3034-1981-2025-30-4-244-251  
EDN: XSQKXL

**For correspondence:** Alena S. Kartseva, PhD, Researcher of Molecular Biology Lab. of the FBIS "State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology" of Rospotrebnadzor, Obolensk, Moscow Region, Russia, e-mail: kartseva@obolensk.org

**Information about authors:**

Kartseva A.S.,	<a href="https://orcid.org/0000-0002-3159-6439">https://orcid.org/0000-0002-3159-6439</a> ;
Silkina M.V.,	<a href="https://orcid.org/0000-0002-5329-2807">https://orcid.org/0000-0002-5329-2807</a> ;
Riabko A.K.,	<a href="https://orcid.org/0000-0001-7478-909X">https://orcid.org/0000-0001-7478-909X</a> ;
Ivashchenko T.A.,	<a href="https://orcid.org/0000-0002-4908-2524">https://orcid.org/0000-0002-4908-2524</a> ;
Romanenko Ya.O.,	<a href="https://orcid.org/0000-0003-1698-6516">https://orcid.org/0000-0003-1698-6516</a> ;
Firstova V.V.,	<a href="https://orcid.org/0000-0002-9898-9894">https://orcid.org/0000-0002-9898-9894</a> .

**Funding.** The work was carried out within the framework of the industry program of the Rospotrebnadzor.

**Conflict of interests.** The authors declare the absence of conflict of interests.

Received 07.09.2025

Accepted 13.11.2025

## ВВЕДЕНИЕ

Живая туляремийная вакцина (ЖТВ) является одной из самых эффективных бактериальных вакцин, обеспечивающая, при незначительной её реактогенности, напряженный и длительный иммунитет к данной инфекции [1]. В Российской Федерации используется зарегистрированная ЖТВ на основе штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ [2]. Ранее проведенные исследования позволили установить, что поствакцинальный иммунитет против туляремии у людей сохраняется, в среднем, в течение 5 лет [3–5]. Этот факт также получил отражение в официальной документации в качестве срока для ревакцинации [6]. Данные выводы были сделаны на результатах кожно-аллергической реакции на тулярин, основанные на реакции гиперчувствительности замедленного типа, которая в настоящее время проводится в редких случаях, так как оказывает дополнительную антигенную нагрузку на организм и характеризуется рядом побочных эффектов [7]. В исследовании Павлович и соавт. с помощью другого аллергического метода – реакции лейкоцитолиза *in vitro* с тулярином, было установлено, что у большинства (87 %) привитых отечественной туляремийной вакциной сохраняется клеточный иммунитет в течении 10–22 лет [8]. Других комплексных исследований по изучению длительности сохранения клеточного и гуморального иммунитета у людей после вакцинации ЖТВ не проводилось.

Для обеспечения иммунопрофилактики инфекционных болезней, в том числе особо опасных, необходимо своевременно и адекватно оценивать эффективность вакцинации. В соответствии со стратегией развития иммунопрофилактики инфекционных болезней, утвержденной распоряжением Правительства РФ от 18.09.2020 № 2390-р и рассчитанной до 2035 года, приоритетными задачами вакцинопрофилактики являются совершенствование методов и инструментов определения уровня и длительности поствакцинального иммунитета в целях выработки тактики дальнейших схем

вакцинации и разработка научных основ персонализированного подхода к вакцинопрофилактике в зависимости от особенностей состояния здоровья и возраста лиц, подлежащих вакцинации. В работе Кудрявцевой О.М. и соавт. был проведен комплексный анализ направленности иммунного ответа и охарактеризована иммунореактивность прививаемых против чумы лиц. Проведенное авторами исследование позволило разработать методологию индивидуальной и групповой коррекции схемы противочумной вакцинации [9]. На настоящий момент аналогичных исследований в контексте противотуляремийной вакцинации не проводилось.

Целью нашего исследования являлся комплексный анализ клеточного и гуморального иммунного ответа для определения оптимальных методов оценки противотуляремийного иммунитета и разработки персонализированных подходов к вакцинации на основе выявленных иммунологических показателей.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

**Доноры.** В исследование было включено 27 человек, из них 12 доноров (средний возраст –  $52,9 \pm 8,2$  лет) многократно вакцинированных ЖТВ по рабочим показаниям и длительностью периода после последней иммунизации 4,5–5 лет, а также 15 добровольцев (средний возраст –  $48,9 \pm 8,4$  лет), составивших группу контроля. Исследование проводилось в соответствии с положениями Хельсинской декларации и Российского законодательства, регламентирующего вопросы здоровья граждан и основ клинической практики. Все участники исследования подписали информированное согласие на обработку индивидуальных данных. Критерием включения для группы вакцинированных доноров являлось наличие двух и более иммунизаций ЖТВ; для контрольной группы – отсутствие контактов с возможителем туляремии и/или его антигенами.

**Выделение и стимуляция мононуклеарных клеток.**

Забор периферической крови у доноров производи-

дили в вакуумные пробирки Vacutte (Greiner-Bio-One, Австрия) с лития гепарином. Далее кровь насылали на градиент плотности Histopaque-1,077 (Sigma, США) в соотношении 1:1 для последующего выделения мононуклеарных клеток (МНК) в соответствии с инструкцией производителя. Выделенные клетки помещали в полную питательную среду следующего состава: среда RPMI 1640 (ПанЭко), 10 % фетальная телячья сыворотка, 2 mM L-глютамин (Sigma, США), 10 mM HEPES (Flow, Англия), 40 мг/л гентамицин, 25 мкМ 2-меркаптоэтанол (Sigma). Жизнеспособность и концентрацию клеток определяли в тесте с красителем трипановым синим (Invitrogen, США) на автоматическом клеточном счетчике TC20 (Bio-Rad, США). Для специфической стимуляции клеток *in vitro* использовали кислото-нерасторвимый комплекс (КНК) *F. tularensis* в концентрации 10 мкг/мл, полученный нами по описанной ранее методике [10]. Туляремийный антиген добавляли к МНК и инкубировали при температуре 37 °C во влажной атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub> в течение 72 ч – для оценки уровня секреции цитокинов; в течение 120 ч – для оценки пролиферативной активности клеток.

**Определение цитокинового профиля.** Оценку антиген-индуцированного синтеза цитокинов определяли в клеточном супернатанте МНК с помощью мультиплексного анализа на системе «Bio-plex» (BioRad, США). В данной работе был использован коммерческий набор ProcartaPlex (Thermo Fisher Scientific, США) со стандартной панелью 1A на 34 цитокина. Дальнейшие манипуляции выполняли в соответствии с протоколом производителя.

**Анализ пролиферативной активности МНК.** Для оценки пролиферативной активности лимфоциты до начала их культивирования окрашивали флуоресцентным красителем CFSE в соответствии с инструкцией производителя (Invitrogen, США). В качестве отрицательного контроля использовали лимфоциты, которые инкубировали в среде без антигена; в качестве положительного – поликлональный активатор клеток Конканавалин A (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 5 мкг/мл. После пятидневной инкубации окрашенные CFSE лимфоциты дополнительно обрабатывали смесью моноклональных антител к поверхностным антигенам CD3 (клон UCHT1) и CD19 (клон Н1В19), конъюгированных соответственно с флуорохромами APC и BV421 (Becton Dickinson, США). После окрашивания моноклональными антителами клетки дважды отмывали избыtkом фосфатно-солевого буфера с 2 % фетальной бычьей сыворотки, фиксировали 2 % формалином и проводили цитометрический анализ в течение 24 ч. Подсчет пролиферирующих клеток проводили на проточном цитофлюориметре FACSaria III (Becton Dickinson, США) на основании снижения уровня флуоресценции CFSE. В каждом образце анализировали не менее 10 000 событий по гейту лимфоцитов.

**Оценка гуморального иммунитета.** Определение титров антител к ЛПС *F. tularensis* в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа по ранее описанной методике [11]. В качестве адсорбированного антигена был использован препарат ЛПС высокой степени очистки в концентрации 10 мкг/мл. Сыворотки (в исходном разведении 1:100) исследовали в двух повторах с двукратным ша-

гом титрования. Связанные антитела детектировали с помощью коньюгата вторичных козьих антител против IgG человека, коньюгированных с пероксидазой хрина (Sigma, США) в рабочем разведении 1:10 000. В качестве субстрата был использован 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (Sigma, США). Учет результатов проводили на приборе Thermo Scientific Varioskan Flash (Thermo Scientific, США), определяя оптическую плотность при длине волны 450 нм. В качестве отрицательного контроля была использована сыворотка невакцинированных доноров. За титр сыворотки принимали разведение, оптическая плотность которого превышала оптическую плотность отрицательной сыворотки в том же разведении не менее чем в 2 раза. Положительными считались сыворотки с титром 1:400 и выше. Сыворотки с титром 1:200 интерпретировали как сомнительный результат.

**Статистическая обработка результатов.** Систематизацию исходной информации, визуализацию полученных результатов и статистическую обработку проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.00 for Windows (GraphPad Prism Software Inc., США). Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха [Me (Q25; Q75)] группы. Статистическую значимость различий между спонтанной и антиген-индуцированной продукцией цитокинов в группе оценивали с использованием критерия Вилкоксона для связанных выборок, между группами вакцинированных и контрольных доноров с помощью U-критерий Манна-Уитни для несвязанных выборок. Различия считались статистически значимыми, если значении р было ниже 0,05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Усиление пролиферации лимфоцитов в ответ на их стимуляцию *in vitro* антигенами отражает специфическую активацию этих клеток и может быть использовано для изучения поствакцинального иммунитета [12].

Мы оценили способность лимфоцитов к спонтанной и индуцированной КНК *F. tularensis* *in vitro* пролиферации, используя для этого метод цитофлюориметрии, основанный на окрашивании внутриклеточного белка витальным флуоресцентным красителем CFSE. Для оценки общего функционального состояния лимфоцитов и их резервных возможностей для стимуляции был использован поликлональный активатор клеток – Con A. После пятидневной инкубации лимфоциты окрашивали моноклональными антителами против поверхностных CD-антigenов и анализировали пролиферативную активность CD3<sup>+</sup> и CD19<sup>+</sup> лимфоцитов. Результаты исследования представлены на рис. 1. В отсутствие антигенной стимуляции пролиферативная активность была минимальной и не различалась между исследуемыми группами. Установлено, что лимфоциты доноров, вакцинированных ЖТВ, отвечали достоверным усилением пролиферации как Т-, так и В-клеток в ответ на рестимуляцию *in vitro* туляремийным антигеном. Как и ожидалось, ConA-индуцированная пролиферация Т- и В-клеток существенно возрастала по сравнению со спонтанной и антиген-индуцированной, статистически значимых различий между исследуемыми группами обнаружено не было.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о сохранении специфического клеточного иммунно-

го ответа через пять лет после последней вакцинации ЖТВ.

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 и поддержанием специфического иммунитета [13]. В ходе дальнейших исследований мы изучили цитокиновый ответ у вакцинированных и контрольных доноров. Концентрацию цитокинов определяли в клеточном супернатанте МНК с помощью мультиплексного анализа с использованием коммерческого набора ProcartaPlex (Thermo Fisher Scientific, США) со стандартной панелью на 34 цитокина. Данный метод представляет собой мультиплексную иммунную реакцию, протекающую на магнитных частицах, с последующим анализом спектра флуоресценции и одновременным определением содержания цитокинов.

Антиген-индукционную продукцию цитокинов сравнивали со спонтанной секрецией, статистическую значимость изменений оценивали с использованием критерия Вилкоксона для связанных выборок. Ответ считали специфичным в случае достоверного изменения уровня продукции цитокина ( $p < 0,05$ ) у вакцинированных доноров, но не в контрольной группе. Если уровень антиген-индукционной секреции цитокина достоверно менялся и у невакцинированных доноров, для оценки специфичности ответа применяли критерий Манна-Уитни для несвязанных выборок.

Сравнительный анализ полученных данных показал, что статистически значимых различий ( $p > 0,05$ ) между спонтанной и антиген-индукционной, а также между группами вакцинированных и контрольных доноров в концентрациях 14 (MIP-1 $\alpha$ , IL-4, IL-7, Eotaxin, IL-12 (p70), IL-31, RANTES, IFN- $\alpha$ , IL-9, TNF- $\beta$ , GRO- $\alpha$ , IL-23, IL-15 и IL-21) из 34 исследуемых цитокинов зарегистрировано не было (данные не приведены).

Сравнительный анализ хемокинов выявил статистически значимое антиген-индукционное увеличение уровней SDF-1 $\alpha$ , IP-10, IL-8, MIP-1 $\beta$  и MCP-1 в группе вакцинированных доноров по сравнению со спонтанной секрецией (рис. 2). Аналогичная тенденция была характерна и для цитокина – фактора роста: статистически значимое повышение медианы GM-CSF в группе вакцинированных доноров при стимуляции

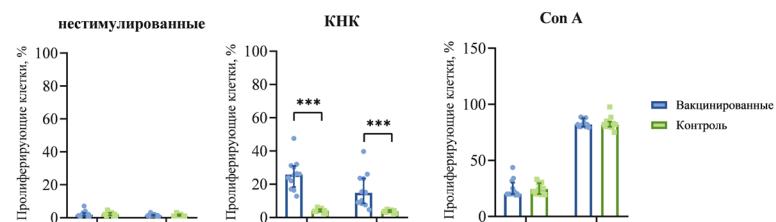


Рис. 1. Спонтанная и индуцированная пролиферация В-клеток (CD19<sup>+</sup>) и Т-клеток (CD3<sup>+</sup>) вакцинированных живой туляремийной вакциной и контрольных доноров.

Примечание: нестимулированные – содержание клеток, инкубированных в питательной среде в отсутствие антигенов; КНК – содержание клеток, стимулированных *in vitro* туляремийным антигеном; Con A – содержание клеток, стимулированных митогеном Concanavalin A, положительный контроль. Данные представлены в виде процента клеток от искомой субпопуляции лимфоцитов. Для сравнения выборок использовался непараметрический критерий Манна-Уитни. \*\*\* $p < 0,0001$ .

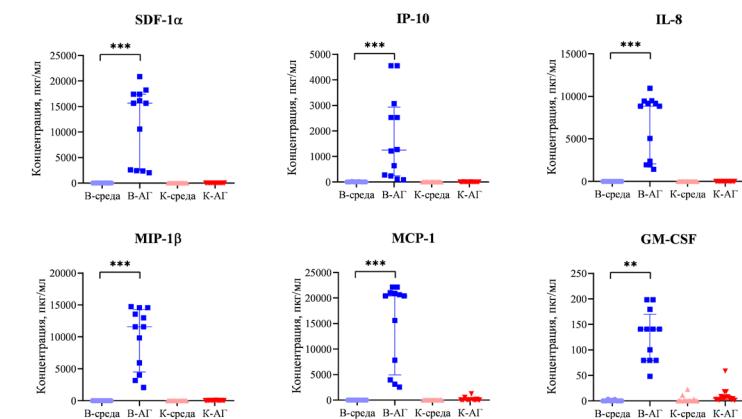


Рис. 2. Спонтанная и антиген-индукционная продукция хемокинов (SDF- $\alpha$ , IP-10, IL-8, MIP-1 $\beta$  и MCP-1) и фактора роста GM-CSF мононуклеарными клетками периферической крови вакцинированных живой туляремийной вакциной и контрольных доноров в ответ на стимуляцию туляремийным антигеном.

Примечание: В-среда – мононуклеарные клетки вакцинированных доноров без стимуляции; В-АГ – мононуклеарные клетки вакцинированных доноров, стимулированные *in vitro* туляремийным антигеном; К-среда – мононуклеарные клетки контрольных доноров без стимуляции; К-АГ – мононуклеарные клетки контрольных доноров, стимулированные *in vitro* туляремийным антигеном. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха группы [Me (Q25; Q75)]. Статистическую значимость различий между спонтанной и антиген-индукционной продукцией цитокинов в группе оценивали с использованием критерия Вилкоксона для связанных выборок, между группами вакцинированных и контрольных доноров с помощью U-критерий Манна-Уитни для несвязанных выборок. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  и \*\*\* $p < 0,0001$ .

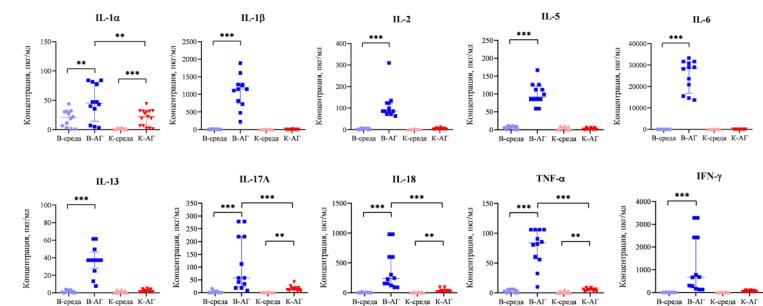


Рис. 3. Спонтанная и антиген-индукционная продукция провоспалительных цитокинов мононуклеарными клетками периферической крови вакцинированных живой туляремийной вакциной и контрольных доноров в ответ на стимуляцию туляремийным антигеном.

Примечание: В-среда – мононуклеарные клетки вакцинированных доноров без стимуляции; В-АГ – мононуклеарные клетки вакцинированных доноров, стимулированные *in vitro* туляремийным антигеном; К-среда – мононуклеарные клетки контрольных доноров без стимуляции; К-АГ – мононуклеарные клетки контрольных доноров, стимулированные *in vitro* туляремийным антигеном. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха группы [Me (Q25; Q75)]. Статистическую значимость различий между спонтанной и антиген-индукционной продукцией цитокинов в группе оценивали с использованием критерия Вилкоксона для связанных выборок, между группами вакцинированных и контрольных доноров с помощью U-критерий Манна-Уитни для несвязанных выборок. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  и \*\*\* $p < 0,0001$ .

ции туляремийным антигеном.

Анализ провоспалительных цитокинов показал, что у вакцинированных доноров установлено статистически значимое повышение синтеза цитокинов семейства IL-1 (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-18) и IL-6 в сравнении со спонтанной секрецией и с аналогичными показателями контрольной группы (рис. 3). Оценка цитокинового ответа позволила также определить хелперную направленность генерируемого вакцинацией иммунитета. Выявлено, что в группе вакцинированных доноров наблюдалось достоверное увеличение уровней цитокинов Т-хелперных клонов 1 типа (IL-2, IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ ), Т-хелперных клонов 2 типа (IL-5 и IL-13) и Т-хелперных клонов 17 типа (IL-17A и IL-22).

Стимуляция МНК *in vitro* туляремийным антигеном приводила к статистически значимому по сравнению с нестимулированными клетками возрастанию антиген-индукционных уровней противовоспалительного цитокина IL-10 как в группе вакцинированных, так и контрольных доноров (рис. 4). Дальнейший анализ при межгрупповом сравнении выявил статистически значимое антиген-индукционное увеличение IL-10 в группе вакцинированных доноров по сравнению со стимулированными клетками контрольной группы. Стимуляция МНК приводила также к статистически значимому увеличению синтеза противовоспалительных цитокинов IL-1RA, IL-27 и IL-22 в группе вакцинированных доноров по сравнению с нестимулированными клетками обеих групп и стимулированными клетками контрольной группы.

Специфические антитела к ЛПС *F. tularensis* рассматривают в качестве критерия оценки напряженности противотуляремийного иммунитета (постинфекционный и вакциненный) как для людей, так и при моделировании туляремийной инфекции на лабораторных животных [14]. Анализ гуморального иммунного ответа проводили методом ИФА, оценивая уровень специфических к ЛПС *F. tularensis* антител в сыворотке крови через 5 лет после вакцинации.

Диагностически значимым титром антител к возбудителю туляремии считается титры 1:400 и выше [11]. Как видно из данных, представленных рисунке 5, в группе вакцинированных ЖТВ были выявлены антитела к ЛПС *F. tularensis* у 83,3 % доноров.

В сыворотках крови доноров контрольной группы антитела, специфичные к ЛПС *F. tularensis*, не превышали пороговых значений.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты данного иммунологического исследования позволили охарактеризовать пролиферативный ответ и цитокиновый профиль МНК иммунизированных ЖТВ

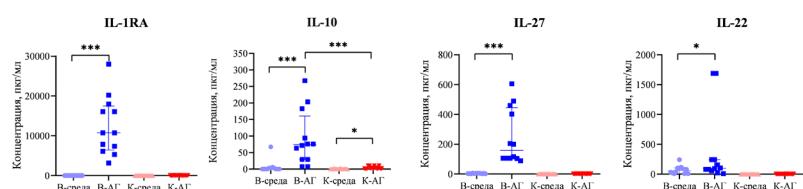


Рис. 4. Спонтанная и антиген-индукционная продукция противовоспалительных цитокинов мононуклеарными клетками периферической крови вакцинированных живой туляремийной вакциной и контрольных доноров в ответ на стимуляцию туляремийным антигеном.

Примечание: В-спрда – мононуклеарные клетки вакцинированных доноров без стимуляции; В-АГ – мононуклеарные клетки вакцинированных доноров, стимулированные *in vitro* туляремийным антигеном; К-спрда – мононуклеарные клетки контрольных доноров без стимуляции; К-АГ – мононуклеарные клетки контрольных доноров, стимулированные *in vitro* туляремийным антигеном. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха группы [Ме (Q25; Q75)]. Статистическую значимость различий между спонтанной и антиген-индукционной продукцией цитокинов в группе оценивали с использованием критерия Вилкоксона для связанных выборок, между группами вакцинированных и контрольных доноров с помощью U-критерий Манна-Уитни для несвязанных выборок. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  и \*\*\* $p < 0,0001$ .

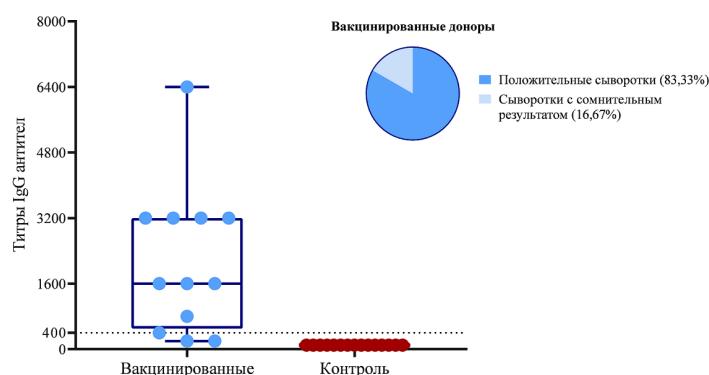


Рис. 5. Частота обнаружения антител к ЛПС *F. tularensis* в сыворотке крови вакцинированных живой туляремийной вакциной и контрольных доноров методом твердофазного иммуноферментного анализа.

Примечания: пунктирной линией указан нижний порог (титр 1:400) диагностически значимых антител. В верхнем правом углу графика представлено распределение сывороток с положительным и сомнительным результатом в группе вакцинированных доноров.

и контрольных доноров. Через 5 лет после вакцинации наблюдается достоверное усиление пролиферации Т- и В-клеток в ответ на рестимуляцию *in vitro* туляремийным антигеном, что отражает наличие популяции антиген-специфических лимфоцитов памяти, способных быстро реагировать при повторном встрече с *F. tularensis*. Отсутствие статистически значимых различий в ConA-индукционной пролиферации между исследуемыми группами подтверждает, что пролиферативный потенциал и жизнеспособность лимфоцитов не различаются между вакцинированными и контрольными донорами. Таким образом, пролиферативный ответ носит антиген-специфический характер и свидетельствует о функциональной сохранности адаптивного клеточного иммунитета с длительностью поствакцинального периода не менее 5 лет.

В наших дальнейших исследованиях был охарактеризован цитокиновый профиль МНК вакцинированных и контрольных доноров в ответ на стимуляцию туляремийным антигеном. Показано, что специфичным для вакцинированных доноров было усиление синтеза хемокинов SDF-1 $\alpha$ , IP-10, IL-8, MIP-1 $\beta$  и MCP-1 и фактора роста GM-CSF: стимуляция туляремийным антигеном не вызывала значимого изменения продукции данных цитокинов у контрольных доноров. Вышеуказанные хемокины играют ключевую роль в клеточном иммунном ответе воспалительного типа, при-

влекая макрофаги, Т-клетки и натуральные киллеры в очаг воспаления. Данный факт согласуется с процессами, наблюдающимися в организме при формировании вторичного иммунного ответа [1], и указывает на то, что поддержание иммунологической памяти опосредуется не только лимфоцитарным звеном, но и усилением врожденных иммунных реакций.

Анализ антиген-индуцированной продукции цитокинов МНК позволил также определить Т-хелперную направленность и антигенную специфичность клеточных реакций иммунного ответа у привитых людей ЖТВ. У вакцинированных доноров при стимуляции клеток туляремийным антигеном возрастала секреция Th1-цитокинов (IL-2, IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ ), Th2-цитокинов (IL-5 и IL-13) и Th17-цитокинов (IL-17A и IL-22).

У вакцинированных доноров зарегистрировано статистически значимое увеличение секреции цитокинов семейства IL-1 (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18), а также IL-6 при стимуляции туляремийным антигеном. Данные цитокины играют ключевую роль в запуске воспалительных реакций, усилении антигенной презентации и активации адаптивного звена иммунитета. IL-18, в частности, способствует синтезу IFN- $\gamma$ , что усиливает Th1-зависимый ответ [15]. Следовательно, повышение IL-1 и IL-6 подтверждает запуск провоспалительных иммунных реакций, направленных на быструю элиминацию возбудителя. Таким образом, можно сделать вывод, что у вакцинированных доноров иммунный ответ поляризован по смешанному Th1/Th2/Th17-типу.

Антиген-индуцированное повышение секреции IL-1RA, IL-27 и IL-22 подтверждает активацию механизмов противовоспалительных иммунных реакций, которые предотвращают избыточное воспаление, тем самым поддерживая иммунный гомеостаз.

У 83,3 % вакцинированных доноров в сыворотках крови сохранялись антитела к ЛПС *F. tularensis* в диагностически значимых титрах (1:400 и выше), что отражает сохранение В-клеток памяти и их способность синтезировать специфические антитела на протяжении 5 лет после последней иммунизации. Таким образом, наличие высокой доли серопозитивных доноров и специфической клеточной активации лимфоцитов Th1/Th2/Th17-направленности свидетельствует о сохранении гуморального и клеточного иммунитета с длительностью поствакцинального периода не менее 5 лет.

В США и странах Западной Европы для производства экспериментальной вакцины используют штамм *F. tularensis* LVS – дериват штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ [1-2]. Несмотря на отсутствие коммерческой вакцины за рубежом, исследования по поиску критериев объективной оценки иммунитета, позволяющих судить о развитии, типе и продолжительности иммунного ответа после вакцинации ЖТВ ведутся. Установлено, IL-17 и IL-22 были идентифицированы как цитокины, которые продукцируются антиген-специфическими к *F. tularensis* Т-клетками памяти людей, привитых вакциной LVS [16].

В статистических моделях прогнозирования эффективности иммунизации вакциной LVS было выявлено, что критериями оценки иммунитета у вакцинированных доноров являются цитокины IL-13, MCP-1, IL-5 и IL-6. Установлено, что после иммунизации вакциной LVS формируется иммунитет, схожий с иммунитетом после естественного заражения туляремией. В этом

же исследовании было показано, что Т-клетки вакцинированных доноров являлись полифункциональными и синтезировали цитокины IFN- $\gamma$  и MIP-1 $\beta$  [17]. Важность полифункциональных Т-клеток подтверждают исследования и в других моделях инфекционных заболеваний. Например, вакцины BCG-MVA85A против туберкулеза [18] и YF-17D против желтой лихорадки [19] индуцировали Т-клетки, продуцирующие комбинации IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 и MIP-1 $\beta$ . На сегодняшний день механизм, посредством которого хемокин MIP-1 $\beta$  оказывает защитное действие и его роль при туляремийной инфекции до конца не изучена. Известно, что он играет важную роль в рекрутовании моноцитов *in vitro* и *in vivo* и, таким образом, может вносить значительный вклад в защиту в сочетании с ключевыми цитокинами, такими как IFN- $\gamma$  [20].

По результатам изучения длительности сохранения иммунитета после вакцинации штаммом *F. tularensis* LVS установлено, что у вакцинированных доноров в течение краткосрочного (3 года) и длительного (более 27 лет) периодов наблюдаются сопоставимые показатели пролиферации лимфоцитов и секреции цитокинов MIP-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 и IL-5 [21]. Таким образом, авторы приходят к выводу, что иммунизация вакциной LVS может привести к практически пожизненному сохранению специфического противотуляремийного Т-клеточного иммунитета.

В периферической крови выздоравливающих людей от туляремийной инфекции обнаруживаются цитокины IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-17 и IL-22, что указывает на схожесть вакцинального и инфекционного иммунных ответов [1, 22]. В исследовании Lindgren H. et al. изучили пролиферативный и цитокиновый ответ мононуклеарных клеток доноров после иммунизации вакциной LVS в трех поствакцинальных периодах – через 1-3 месяца и 1 год. Выявлено, что после вакцинации наблюдались высокие уровни пролиферативной активности Т-клеток иммунизированных доноров в течение 1 года и были сопоставимы во все исследуемые сроки [23]. Полученные авторами результаты подтверждают ранее опубликованные данные о значимости цитокинов IL-2, IL-5, IL-13, IL-17, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , MCP-1, MIP-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  в поствакцинальном иммунном ответе и демонстрируют важность секреции IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-7, IL-8 и IL-12 клетками. Секреция всех вышеуказанных цитокинов регистрировалась в течение 1 года после вакцинации с отсутствием тенденции к снижению.

В другом исследовании, использование системы совместного культивирования клеток позволило определить цитокины, участвующие в контроле туляремийной инфекции. Добавление лимфоцитов вакцинированных доноров к инфицированным штаммами *F. tularensis* Schu S4 или *F. tularensis* LVS макрофагам приводило к контролю над инфекцией и коррелировало с секрецией цитокинов IFN- $\gamma$ , TNF и MIP-1 $\beta$  [24]. Такая *in vitro* модель туляремийной инфекции может быть полезной для оценки вклада отдельных цитокинов, например, путём истощения одного или нескольких одновременно цитокинов или посредством добавления комбинаций рекомбинантных цитокинов при культивировании.

Суммируя полученные результаты в ходе исследования и литературные данные можно заключить, что через 5 лет после иммунизации ЖТВ сохраняется на-

пряженный противотуляремийный иммунитет и необходимо рассмотреть возможность увеличения интервала между ревакцинациями, что позволит сократить число инъекций и финансовые затраты без ущерба для эффективности специфической профилактики. В качестве критерия оценки клеточного иммунитета предлагается рассматривать антиген-индуцированную пролиферацию лимфоцитов на основании установленной корреляции между уровнями пролиферативной и цитокиновой-продуцирующей активности клеток.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные данные обосновывают переход к схеме ревакцинации, основанной на контроле специфического противотуляремийного гуморального и клеточного иммунитета. Адекватными критериями оценки противотуляремийного иммунитета могут быть наличие уровня специфических антител к ЛПС *F. tularensis* (1:400 и выше) в сыворотке крови и специфическая пролиферативная активность лимфоцитов вакцинированных доноров в ответ на стимуляцию туляремийным антигеном.



## ЛИТЕРАТУРА (ПП. 1-2, 12, 15-24 СМ. REFERENCES)

3. Олсульев Н.Г. Эффективность вакцинации против туляремии. М: Акад. Мед. Наук СССР, 1953.
4. Олсульев, Н.Г. Текущее состояние изучения профилактики туляремийной вакциной. *Вестн. Акад. Мед. Наук СССР*. 1958;11: 63-72.
5. Савельева Р.А., Ананова Е.В., Пронин А.В. Определение продолжительности поствакцинального иммунитета против туляремии. *Журн. микробиол.* 1995;6:51-52.
6. Инструкция по применению вакцины живой туляремийной сухой. Available at: <https://www.microgen.ru/products/vaktsiny/vaktsina-tulyaremiyayna-zhivaya/>
7. Дятлов И.И., Фирстова В.В., Бондаренко Н.Л., Карапулов А.В. Стратегия оценки поствакцинального иммунитета против чумы и туляремии. *Аллергология и иммунология*. 2016; 17(2): 112-114.
8. Аронова Н.В., Оноприенко Н.Н., Цимбалистова М.В., Павлович Н.В. Сравнительный анализ показателей гуморального и клеточного специфического иммунитета у людей, иммунизированных живой туляремийной вакциной. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2014; 5: 32-37.
9. Кудрявцева О.М., Гончарова А.Ю., Ожевников В.К., Бугоркова С.А. Комплексный подход к оценке и прогнозированию иммунного ответа на вакцинацию у привитых против чумы людей. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2024; (3): 118-125. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-3-118-125
10. Сомов А.Н., Кравченко Т.Б., Павлов В.М., Вахрамеева Г.М., Комбарова Т.И., Миронова Р.И. и др. Антигенные и иммуногенные свойства кислотонерастворимого комплекса *Francisella tularensis* штамма 15 НИИЭГ в растворимой, адсорбированной и микрокапсулированной формах. *Биотехнология*. 2017; (5): 23-34. DOI: 10.21519/0234-2758-2017-33-5-23-34
11. Горбатов А.А., Соловьёв П.В., Баранова Е.В., Титарёва Г.М., Куликолова Е.С., Бикетов С.Ф. и др. Сравнительное исследование экспериментальных и коммерческих серологических тестов для определения противотуляремийных антител у людей. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63(10): 630-635. DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-10-630-635
13. Симбирцев А.С. Цитокины: классификация и биологические функции. *Цитокины и воспаление*. 2004; 3(2): 16-22.
14. Горбатов А.А., Титарёва Г.М., Комбарова Т.И., Шайхутдинова Р.З., Кравченко Т.Б., Миронова Р.И. и др. Особенности гуморального ответа при экспериментальной туляремии животных с разной чувствительностью к инфекции. *Инфекция и иммунитет*. 2019; 9(2): 262-272. DOI: 10.15789/2220-7619-2019-2-262-272
1. Roberts L.M., Powell D.A., Frelinger J.A. Adaptive immunity to *Francisella tularensis* and considerations for vaccine development. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018; 8: 115. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00115
2. Jia Q., Horwitz M.A. Live attenuated tularemia vaccines for protection against respiratory challenge with virulent *F. tularensis* subsp. *tularensis*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018; 8: 154. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00154
3. Olsuf'ev N.G. Effektivnost' vaksinatsii protiv tularemii [Efficiency of vaccination against tularemia]. Moscow: Acad. Med. Nauk SSSR; 1953. (in Russian)
4. Olsuf'ev N.G. Tekushchee sostoianie izuchenii profilaktiki tulairemiinoi vaktsinoi [Current state of the study of prophylaxis with tularemia vaccine]. *Vestn Akad Med Nauk SSSR*. 1958; 11: 63-72. (in Russian)
5. Savel'eva R.A., Ananova E.V., Pronin A.V. Opredelenie prodolzhitel'nosti postvaktsinal'nogo imuniteta protiv tularemii [Determination of the duration of post-vaccination immunity against tularemia]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* 1995;6:51-2. (in Russian)
6. Instruktsiya po primeneniyu vaktsiny zhivoi tulairemiinoi sukhoy. Available at: <https://www.microgen.ru/products/vaktsiny/vaktsina-tulyaremiyayna-zhivaya/>
7. Dyatlov I.I., Firstova V.V., Bondarenko N.L., Karaulov A.V. Evaluation strategy of postvaccination immunity against plague and tularemia. *Allergologiya i immunologiya*. 2016; 17(2): 112-114. (in Russian)
8. Aronova N.V., Onoprienko N.N., Tsimbalistova M.V., Pavlovich N.V. Comparative analysis of parameters of humoral and cell specific immunity in individuals immunized with a live tularemia vaccine. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2014; 5: 32-37. (in Russian)
9. Kudryavtseva O.M., Goncharova A.Yu., Kozhevnikov V.A., Bugorkova S.A. Multifaceted approach to assessing and forecasting the immune response to vaccination in population immunized against plague. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2024; 3: 118-125. (in Russian) DOI: 10.21055/0370-1069-2024-3-118-125
10. Somov A.N., Kravchenko T.B., Pavlov V.M., Vakhrameeva G.M., Kombarova T.I., Mironova R.I., Firstova V.V., Kalmantaeva O.V., Vetchinin S.S., Mokrievich A.N. Antigenic and immunogenic characteristics of dissolved, adsorbed and microencapsulated formulations of acidinsoluble complex from *Francisella tularensis* 15 NIIG Strain. *Biotekhnologiya*. 2017;(5):23-34. DOI: 10.21519/0234-2758-2017-33-5-23-34 (in Russian)
11. Gorbatov A.A., Soloviev P.V., Baranova E.V., Titareva G.M., Kulikalova E.S., Biketov S.F., Mazepa A.V. A comparative study of experimental and commercial serological tests for detection of antibodies in humans with tularemia. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2018; 63(10): 630-635. (in Russian). DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-10-630-63512.
12. Thakur A., Pedersen L.E., Junghansen G. Immune markers and correlates of protection for vaccine induced immune responses. *Vaccine*. 2012; 30(33): 4907-4920. DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.05.049
13. Simbirtsev A.S. Cytokines – classification and biologic functions. *Tsitoliny i vospalenie*. 2004;3(2):16–22. (in Russian)
14. Gorbatov A.A., Titareva G.M., Kombarova T.I., Shaikhutdinova R.Z., Kravchenko T.V., Mironova R.I., Bakhteeva I.V., Aronova N.V., Pavlovich N.V., Mokrievich A.N., Firstova A.A. Features of humoral answer in experimental animal tularemia with different sensitivity to infection. *Infektsiya i immunitet*. 2019;9(2):262-272. DOI: 10.15789/2220-7619-2019-2-262-272 (in Russian)
15. Krocova Z., Macela A., Kubelkova K. Innate Immune Recognition: Implications for the interaction of *Francisella tularensis* with the host immune system. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017; 7: 446. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00446
16. Paranavitana C., Zelazowska E., DaSilva L., Pittman P.R., Nikolich M. Th17 cytokines in recall responses against *Francisella tularensis* in humans. *J Interferon Cytokine Res.* 2010; 30(7): 471-6. DOI: 10.1089/jir.2009.0108.
17. Eneslått K., Normark M., Björk R., Rietz C., Zingmark C., Wolfram L.A., et al. Signatures of T cells as correlates of immunity to *Fran-*

## REFERENCES



