

ЛЯПИНА АННА МИХАЙЛОВНА

**ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА У ЛЮДЕЙ,
ВАКЦИНИРОВАННЫХ ЖИВОЙ ЧУМНОЙ ВАКЦИНОЙ**

3.2.7. Иммунология

3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Екатеринбург – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» Минздрава России)

Научные руководители:

Доктор медицинских наук, профессор

Елисеев

Юрий Юрьевич

Доктор медицинских наук, профессор

Федорова

Валентина Анатольевна

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук, главный научный сотрудник, руководитель лаборатории цитокинов Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского)

**Топтыгина Анна
Павловна**

Доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры клинической лабораторной диагностики и патологической анатомии Академии постдипломного образования Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ ФНКЦ ФМБА России)

**Казаков
Сергей Петрович**

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России).

Защита диссертации состоится «20» марта 2025 года в 12.00 часов на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук 24.1.063.01 на базе ФГБУН Института иммунологии и физиологии УрО РАН по адресу: 620078, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке УрО РАН по адресу: 620078, г. Екатеринбург, ул. Софьи Ковалевской/Академическая, 22/20 и на сайте ИИФ УрО РАН (<http://iir.uran.ru>), с авторефератом – там же и на сайте ВАК РФ (<http://vak2.ed.gov.ru>).

Автореферат разослан «___» _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета 24.1.063.01,
кандидат биологических наук

Ю.А. Журавлёва

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Разработка и совершенствование методов оценки качества поствакцинального иммунитета является актуальным направлением современной иммунологии и вакцинологии. Особенно значимым это становится в настоящее время, когда на фоне появления новых и возрастания рисков возникновения вспышек уже известных, ре-эмерджентных инфекционных заболеваний, необходимо быстрое обеспечение стойкого и эффективного специфического иммунитета у населения. Эта задача требует не только создания современного арсенала средств специфической профилактики, но также методов оценки их эффективности на популяционном и индивидуальном уровне.

Традиционно на популяционном уровне эффективность вакцинации оценивается по эпидемиологическим показателям. Их использование, однако, не отражает наличие иммунитета на уровне индивидуума, а также неприменимо в случае редко встречающихся заболеваний. Способность вакцины вызывать формирование иммунитета непосредственно у привитого характеризует иммунологическая эффективность вакцинации, оценку которой проводят по измерению иммунологических маркеров, например, определению уровня специфических антител (Брико Н.И. и соавт., 2001, 2014). Базовыми характеристиками подобных показателей являются высокая специфичность, позволяющая идентифицировать именно поствакцинальный иммунный ответ, а также возможность их объективного измерения (Van Tilbeurgh M. et al., 2021). В случае установления статистически значимой корреляции показателей вакциноиндуцированных иммунологических реакций с уровнем защиты вакцинированного (корреляты протекции), они могут быть использованы для разработки критериев оценки иммунологической эффективности вакцинации и в качестве суррогатных «конечных точек» при создании вакцинных препаратов нового поколения (Plotkin S.A., 2008; Plotkin S.A., Gilbert P.B., 2012, Escudero-Pérez V. et al., 2023).

Большинство современных вакцин опосредуют свое протективное действие за счет индукции специфических антител. В связи с этим, поиск иммунологических показателей для них ограничивается оценкой гуморального звена иммунитета. Однако для инфекционных заболеваний, протективный иммунный ответ при которых медиирован не только гуморальными, но и клеточными реакциями адаптивного ответа, проблема оценки качества поствакцинального иммунитета остается сложной задачей. Примером таких инфекций является чума, индукция протективного иммунитета против которой требует согласованного синергизма гуморального и клеточного звеньев иммунитета (Anderson G.W.Jr. et al., 1997; Hill J. et al., 2003; Philipovski A.V., Smiley S.T., 2007; Kummer L.W. et al., 2008; Lin J.S. et al., 2010). Специфическая профилактика чумы в РФ проводится посредством введения живой чумной вакцины на основе аттенуированного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ (ЖЧВ), используемой для вакцинации людей по эпидемическим показаниям и у лиц, работающих с патогенами 1-2 групп патогенности, с 30-х годов XX столетия (Коробкова Е.И., 1956; Feodorova V.A. et al., 2009, 2012, 2014; Бугоркова С.А. с соавт., 2013, 2018).

Степень разработанности темы. На сегодняшний день характеристика поствакцинального иммунитета, индуцированного введением ЖЧВ, базируется, в основном, на исследовании иммунного ответа к двум наиболее известным иммуногенам: капсульному антигену F1 и антигену вирулентности LcrV (Фирстова В.В., 2015; Ключева С.Н. с соавт., 2018; Бугоркова С.А. с соавт., 2018; Sagiyeu Z. et al., 2019). Многочисленные работы демонстрируют не только значимость указанных белков в индукции гуморального постинфекционного и поствакцинального противочумного иммунитета, но и их кросс-реактивный потенциал (Басова Н.Н. с соавт., 1982; Rasoamanana B. et al., 1997; Коссе Л.В., Лебедева С.А., 1998; Williamson E.D. et al., 2005; Фирстова В.В., 2015). Хотя формирование клеточного иммунитета является критическим для протекции против данного заболевания, в ряде исследований была показана слабая вовлеченность как LcrV, так и F1 в генерацию реакций клеточного иммунного ответа у иммунизированных цельноклеточными противочумными живыми вакцинами людей и биомоделей (Williamson E.D. et al., 2005; Firstova V.V. et al., 2012; Li B. et al., 2012; Фирстова В.В., 2015).

В то же время роль других ключевых белков возбудителя в формировании поствакцинального иммунитета при вакцинации человека ЖЧВ исследована недостаточно. К ним относятся компоненты системы секреции третьего типа (ТЗСС) и представитель семейства OmpTin активатор плазминогена Pla (Cornelis G.R., 2002; Sebbane F. et al., 2020). Известно, что выраженными антигенными свойствами обладают Pla, белки-эффекторы ТЗСС YopE, YopM, а также структурная субъединица инъектосомы ТЗСС YscF; в последние годы накоплены данные о протективности YopE и YscF на мышинной модели (Easterbrook T.J. et al., 1995; Benner G.E. et al., 1999; Feodorova V.A., Devdariani Z.L., 2001; Matson J.S. et al., 2005; Swietnicki W. et al., 2005; Verma S.K. et al., 2019) и Pla – на модели лабораторных крыс (Erova T.E. et al., 2013). Данные белки в сочетании с современными вариантами иммуноанализа являются перспективными молекулярными мишенями в качестве основы для разработки новых методов диагностики и профилактики чумы, в том числе, совершенствования методов оценки постинфекционного и поствакцинального иммунитета.

Не менее важным аспектом является разработка методов иммуноанализа для оценки поствакцинального иммунного ответа, отличающихся высокой диагностической информативностью. В настоящее время для детекции антикапсульных антител широко применяется твердофазный иммуноферментный анализ (ТИФА) (Rasoamanana B. et al., 1997; Девдариани З.Л. с соавт., 2013; Bezerra M.F. et al., 2022). Тем не менее, по литературным данным, серопревалентность к F1 у привитых ЖЧВ, оцениваемая в ТИФА в течение года после вакцинации или ревакцинации, может колебаться в пределах от 4 до 85 % (Бугоркова С. А., 2018), кроме того, нередко регистрируется наличие антител к F1 у наивных доноров (Басова Н. Н. с соавт., 1982; Фирстова В.В. с соавт., 2015). Повышение специфичности анализа может быть достигнуто применением вариантов ТИФА, таких как иммуноблоттинг (ИБ), позволяющий визуализировать специфическое взаимодействие антигена и антитела на мембранном носителе (Neubauer H. et al., 2000).

Одной из основных проблем при разработке современных чумных вакцин считается относительно небольшая продолжительность специфического защитного

иммунитета. На биомоделях показано, что протективный иммунитет при вакцинации ЖЧВ имеет длительность до 1 года (Коробкова Е.И., 1956; Наумов А.В. с соавт., 1992; Дентовская С.В. с соавт., 2013; Feodorova V.A. et al., 2014), однако исследования отдаленного иммунного ответа на вакцинацию ЖЧВ у людей ограничиваются единичными сообщениями (Девдариани З.Л. с соавт., 1997; Уткин Д.В. с соавт., 2019). Поэтому поиск маркеров как раннего, так и отдаленного специфического поствакцинального иммунитета, вызываемого ЖЧВ, является приоритетной задачей.

Большинство исследований иммунного ответа к ЖЧВ осуществлялось с применением белков, полученных путем химической экстракции. В этом случае примеси липополисахарида (ЛПС) в препаратах могут значительно изменять характеристики иммунного ответа макроорганизма (Книрель Ю.А., Анисимов А.П., 2012), что особенно значимо при анализе реакций клеточного иммунитета. Использование в качестве сенситинов высокоочищенных рекомбинантных белков позволяет определять гомологичный специфический ответ непосредственно к таргетным иммуногенам.

В последние годы было показано, что механизмы формирования противобактериальной иммунной защиты при вакцинации ЖЧВ включают клеточные реакции по Th1-, Th2- и Th17-пути (Щуковская Т.Н. с соавт., 2011; Бугоркова С.А. с соавт., 2018; Ключева С.Н. с соавт., 2018, 2022; Корытов К.М. с соавт., 2018, 2021). Однако антигенная специфичность клеточных реакций не установлена.

В связи с вышеизложенным, исследование особенностей иммунного ответа у вакцинированных ЖЧВ людей с использованием расширенной панели сенситинов, включающей высокоочищенные рекомбинантные белки F1 и LcrV, Pla, YopM, YopE, YscF, в целях определения наиболее специфичных маркеров поствакцинального гуморального и клеточного иммунитета, пригодных для разработки экспериментальных иммунотестов, представляется актуальным направлением исследований.

Цель исследования: анализ специфичности и длительности гуморального и клеточного поствакцинального иммунитета у доноров, вакцинированных живой чумной вакциной, с использованием панели рекомбинантных белков F1, LcrV, Pla, YopM, YopE, YscF для определения иммунологических маркеров, перспективных для оценки качества иммунного ответа на живую чумную вакцину в экспериментальных иммунотестах.

Задачи исследования:

1. Определить иммунореактивность сывороток вакцинированных живой чумной вакциной и наивных доноров с использованием панели высокоочищенных рекомбинантных белков – F1, LcrV, Pla, YopM, YopE и YscF.

2. Оценить длительность циркуляции антиген-специфических антител у вакцинированных живой чумной вакциной доноров со сроком поствакцинального периода до и более 1 года.

3. Охарактеризовать функциональные показатели клеточных реакций (пролиферативный ответ и антиген-индуцированный профиль Th1/Th2/Th17 цитокинов) вакцинированных живой чумной вакциной и наивных доноров в реакциях *in vitro* с панелью рекомбинантных белков – F1, LcrV, Pla, YopM, YopE и YscF.

4. Определить параметры антиген-специфического клеточного иммунного ответа, индуцированного живой чумной вакциной, в том числе у вакцинированных доноров со сроком поствакцинального периода до и более 1 года.

5. Разработать экспериментальные иммунотесты на основе методов твердофазного иммуноферментного анализа и иммуноблоттинга и панели рекомбинантных сенситинов, пригодных для выявления иммунных антител при оценке качества поствакцинального иммунитета, индуцированного живой чумной вакциной.

6. Определить диагностическую информативность экспериментальных иммунотестов на основе рекомбинантных сенситинов для оценки качества иммунного ответа, индуцированного живой чумной вакциной.

Научная новизна. Впервые проведена комплексная характеристика иммунного ответа, исследована иммунореактивность сывороток, пролиферативная активность мононуклеарных клеток периферической крови (МНК) и профили продуцируемых ими цитокинов у людей, привитых ЖЧВ, с использованием панели высокоочищенных рекомбинантных белков F1, LcrV, Pla, YopM, YopE и YscF.

Впервые в сыворотках крови вакцинированных ЖЧВ людей, помимо антител к капсульному антигену F1, выявлено наличие специфических иммуноглобулинов к линейным эпитопам структурообразующей единицы инъектосомы YscF и белку-эффектору T3SS YopE. Показано, что антитела, специфичные к F1 и YscF, определяются у вакцинированных доноров спустя, в среднем, 15 лет (в отдельных случаях – до 30 лет) после последней вакцинации ЖЧВ, а антитела к YopE не определяются спустя год после вакцинации.

Впервые у людей, вакцинированных ЖЧВ, установлено развитие специфического адаптивного иммунного ответа по смешанному Th1/Th2/Th17-типу. Впервые определена антигенная специфичность и длительность выявленных клеточных реакций: показано, что в индукцию Th1-цитокинов вовлечены F1, Pla, YopM, YopE и YscF, Th2-цитокинов – F1, LcrV и YscF, тогда как активатор плазминогена Pla участвует в Th-17-поляризации иммунного ответа. Впервые получены данные о длительной (от 2 до 30 лет, в среднем, 15 лет) циркуляции в периферической крови доноров, вакцинированных ЖЧВ, пула лимфоцитов, специфичных к указанным белкам.

Показаны перспективы применения выявленных гуморальных и клеточных маркеров для усовершенствования методов оценки качества поствакцинального иммунитета, индуцированного ЖЧВ, с использованием экспериментальных тестов на основе рекомбинантных сенситинов.

Теоретическая и практическая значимость работы. В диссертационной работе представлены новые данные об особенностях иммунного ответа, индуцированного вакцинацией ЖЧВ у людей: определены таргетные иммуногены и дана характеристика иммунологических реакций с их участием. Показано, что специфичным для привитых ЖЧВ является обнаружение антител к капсульному антигену F1, линейным эпитопам YscF и белку-эффектору YopE, а также достоверное повышение уровня Th1/Th2/Th17-цитокинов при стимуляции МНК вакцинированных доноров панелью исследуемых белков. Выявлены иммуногены, участвующие в раннем (до одного года) или отдаленном (2–30 лет) специфическом иммунном ответе на вакцинацию ЖЧВ.

Практическая значимость работы заключается в том, что обнаруженные специфические реакции вакциноиндуцированного иммунитета могут служить основой для выявления иммунологических маркеров оценки напряженности поствакцинального иммунитета у людей, вакцинированных ЖЧВ, в том числе, для разработки соответствующих коррелятов протекции. Разработаны экспериментальные иммунотесты для определения специфических антител, индуцированных ЖЧВ.

Методология и методы исследования. Методология диссертационной работы была основана на анализе литературных данных, связанных с исследованием особенностей постинфекционного и поствакцинального противочумного иммунитета, и современных методах его оценки у привитых биомоделей и людей. Для реализации поставленной цели были разработаны критерии включения в исследование, основанные на длительности поствакцинального периода у привитых ЖЧВ, определены этапы выполнения диссертационной работы, подобраны панель потенциальных маркеров поствакцинального иммунного ответа и методы исследования гуморального и клеточного иммунитета. Специальные методы исследования включали, прежде всего, современные иммунологические методы – различные вариации ТИФА, ИБ и реакцию бластной трансформации лимфоцитов с применением в качестве сенситинов панели высокоочищенных рекомбинантных белков возбудителя. Также в работе были использованы социологические (интервьюирование и сбор данных у доноров) методы и широкий набор статистических методов с применением современного специализированного компьютерного программного обеспечения.

Положения, выносимые на защиту:

1. Гуморальный иммунный ответ привитых живой чумной вакциной доноров разнообразен и может проявляться как образованием специфических антител к нескольким иммуногенам чумного микроба одновременно, так и их отсутствием; при этом антитела, определяемые методами твердофазного иммуноферментного анализа и иммуноблоттинга, специфичны к F1 и линейным эпитопам YscF и YopE, но не таким антигенам вакцинного штамма как LcrV, YopM и Pla.

2. Длительность циркуляции антител различной антигенной специфичности у привитых живой чумной вакциной доноров неодинакова и колеблется от года после последней вакцинации (анти-YopE-антитела) до, в среднем, 15 лет после нее (антикапсульные антитела и антитела к линейным эпитопам YscF).

3. У привитых живой чумной вакциной реакции клеточного иммунитета носят долговременный характер (в среднем, 15 лет после последней иммунизации) и поляризованы по смешанному, Th1/Th2/Th17-типу; при этом в индукцию Th1-цитокинов вовлечены такие иммуногены как F1 (IFN- γ , TNF- α), Pla, YopM, YopE (IFN- γ) и YscF (TNF- α), Th2-цитокинов – F1 (IL-4), LcrV и YscF (IL-10), Th-17 – Pla (IL-17A).

4. Разработанные экспериментальные тест-системы на основе рекомбинантных белков позволяют достоверно дифференцировать привитых живой чумной вакциной доноров с различной диагностической информативностью: оптимальными показателями специфичности и чувствительности (100 % и 100 %) обладает иммунотест на основе иммуноблоттинга с рекомбинантным YscF.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов определяется использованием в работе высокоочищенных рекомбинантных белков, исследованием достаточного количества опытных объектов (материал от 34 доноров, вакцинированных ЖЧВ), формированием группы контроля (17 здоровых, непривитых ЖЧВ доноров), применением современных иммунологических и релевантных статистических методов (непараметрическая статистика для малых выборок), тщательным анализом полученных результатов в соотнесении с современными литературными данными.

Основные результаты диссертационной работы были представлены на научных конференциях различного уровня: III научно-практической конференции с международным участием «Инфекции, обусловленные иерсиниями» (Санкт-Петербург, 2011); II Всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (Санкт-Петербург, 2012); III международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2012); 65, 6, 7, 12-м Vaccine & ISV Конгрессе (Сиэтл, США, 2011; Шанхай, КНР, 2012; Сиджес, Барселона, Испания, 2013; Будапешт, Венгрия, 2018); 11, 12, 13-м Международном симпозиуме по иерсиниям (Суджоу, КНР, 2013; Тбилиси, Грузия, 2016; Антананариву, Мадагаскар, 2019); 5, 7, 8-м Конгрессе Федерации Европейских микробиологических обществ (FEMS) (Лейпциг, Германия, 2013; Валенсия, Испания, 2017; Глазго, Шотландия, 2019); 5-м Европейском конгрессе по иммунологии (ECI) (Амстердам, Нидерланды, 2018); FEMS online conference on Microbiology (2020); II Российском конгрессе по медицинской микробиологии и инфектологии (РККМИ) (Москва, 2024).

Внедрение результатов исследования в практику. Основные результаты исследования и разработанные методологические подходы внедрены в научно-исследовательскую работу кафедры клинической иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России. Материалы диссертационного исследования внедрены в практику учебной работы ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России и используются для обучения студентов, ординаторов, аспирантов, по дисциплине «инфекционные болезни», ординаторов и слушателей циклов профессиональной переподготовки и повышения квалификации по специальности «клиническая лабораторная диагностика».

Место выполнения работы и личный вклад соискателя. Работа выполнена на базе ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ имени В.И. Разумовского» Минздрава России, отдельные эксперименты выполнялись на базе лицензированной научной бактериологической лаборатории ГОУ ВПО «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» и лаборатории молекулярной биологии и нанобиотехнологий ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии», филиал в Саратове, в рамках гранта РФФИ (проект № 18-016-00159, руководитель проекта – проф., д.м.н. Федорова В.А.). Выбор темы диссертационной работы, формулировка целей и задач, выбор методов исследования и оформление публикаций осуществлялись совместно с научными руководителями. Получение

первичных данных, их систематизация и обобщение, а также анализ результатов и написание текста диссертационной работы выполнены автором лично.

Публикации по теме диссертации. По теме диссертации опубликовано 25 работ, из них 3 – в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России и/или индексируемых в международных базах данных WoS и Scopus (Q1 и Q2).

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 190 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 12 таблицами и 8 рисунками. Указатель литературы включает 380 источников, из них 84 отечественных и 296 зарубежных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Участники исследования. В исследование был включен 51 человек: 34 донора, вакцинированных ЖЧВ (опытная группа, A-Total) с разным числом вакцинаций (1–51 иммунизаций) и различной длительностью периода после последней иммунизации ЖЧВ (от 0 до 30 лет), и 17 условно здоровых добровольцев, составивших группу контроля (группа B). Группа A-Total так же подразделялась на две подгруппы доноров в зависимости от сроков забора биоматериала после последней вакцинации ЖЧВ: A-RV (recently vaccinated, недавно вакцинированные) – в течение не более чем 1 года (n=14), и A-EV (early vaccinated, ранее вакцинированные) – в сроки более 1 года (n=20).

Получение сывороток крови. Кровь забирали из локтевой вены, натошак, в объеме 20 мл. Сыворотки получали путем отстаивания крови при комнатной температуре с образованием сгустка без использования коагулянтов и последующим удалением эритроцитов центрифугированием при 3500 об/мин.

Панель рекомбинантных сенситинов. Панель из шести высокоочищенных рекомбинантных белков F1, LcrV, Pla, YopM, YopE и YscF была получена, как описано ранее (Braciale V.L. et al., 2008), путем клонирования в векторе *E. coli* с последующей очисткой аффинной хроматографией. Остатки ЛПС удаляли обработкой полимиксином В, уровень содержания ЛПС в конечных препаратах составил <0,1 EU/мл.

Постановка твердофазного иммуноферментного анализа. Условия ТИФА подбирали индивидуально для каждого рекомбинантного белка из панели. Сенситины сорбировали в 0,1 М карбонатном буфере в концентрации 2 мкг/мл с (Pla, YopE, YscF) либо без (F1, LcrV, YopM, YscF) предварительного растворения в 8М мочеvine при постепенном нагревании до 45/97°C, вносили в лунки 96-луночного планшета (Immulon 2 HB plates (Thermo Scientific), Maxisorb (Nunc), США) и инкубировали 18 часов при температуре 4°C. Для блокировки, разведения антител и антивидового конъюгата (Goat Anti-Human IgG (Fab specific), Sigma, США) использовали 20 % раствор сыворотки новорожденного теленка (NCS) (Sigma, США) в фосфатно-солевом буфере с 0,05 % Tween-20 (PBST), в качестве хромогенного субстрата использовали 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (TMB) (Sigma, США).

Постановка иммуноблоттинга. ИБ проводили по базовому протоколу (Braciale V.L. et al., 2008) с модификациями. Препараты рекомбинантных белков и лизаты бактерий, предварительно фракционированные в 12,5 % (Pla, LcrV, YopM) или 15 % (F1, YopE, YscF) SDS-ПААГ, переносили на нитроцеллюлозную мембрану (НЦМ) с диаметром пор 0,22 мкм (BioRad). Для блокировки, разведения антител и антивидового конъюгата (Goat Anti-Human IgG Antibody, F(ab')₂, HRP conjugate, Chemicon, Германия) использовали 20 % раствор NCS (Sigma, США) в PBST, в качестве хромогенного субстрата использовали ТМВ (Sigma, США). Реакцию учитывали визуально по окраске специфических реплик.

Постановка реакции бластной трансформации лимфоцитов (РБТЛ). МНК выделяли из венозной крови на градиенте плотности по стандартной методике (Boyum A., 1968), высевали в 96-луночные планшеты Costar (Corning, США) в концентрации 1×10^5 кл./луночке и культивировали в среде DMEM/F12 (Биолот, Россия), дополненной 10 % FBS (Sigma, США) и 1 % раствора антибиотика-антимикотика (Sigma, США), в течение 6 дней. Клетки стимулировали добавлением 5 мкг/мл рекомбинантных белков F1, LcrV, Pla, YopM, YopE, YscF и инактивированных цельноклеточных препаратов ЖЧВ Yp26 и Yp37 в концентрации 2×10^6 м.кл./мл. Коммерческий митоген ConA (Sigma, США) в дозировке 2 мкг/мл использовали как позитивный контроль, сравнение проводили с негативным контролем без добавления сенситинов. Пролиферативный ответ учитывали с использованием набора Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent) (Roche Applied Science, США) в соответствии с инструкциями производителя. Индекс пролиферации (ИП) подсчитывали как отношение среднего значения относительных световых единиц в сек (rlu/сек), полученных от лунок с антиген-стимулированными МНК, к среднему значению rlu/сек, зарегистрированному от нестимулированного контроля.

Анализ антиген-стимулированной продукции Th1/Th2/Th17 цитокинов. Супернатанты для исследования на цитокины забирали на 5-е сутки из лунок с стимулированными/нестимулированными МНК. Анализ на спонтанную, митоген- и антиген-стимулированную продукцию IFN- γ , IL-4, IL-17A, TNF- α и IL-10 проводили с применением коммерческих ТИФА-наборов (Вектор-Бест, Цитокин, Россия) согласно инструкции производителя.

Статистический анализ. Статистическую обработку данных выполняли в программе GraphPad Prism v. 6.01 (GraphPad Software Inc., США). Для анализа были использованы непараметрические методы: точный критерий Фишера при сравнении независимых групп по бинарному признаку; критерий Вилкоксона при сравнении двух связанных групп по количественному признаку; критерий Манна-Уитни при сравнении двух независимых выборок по количественному признаку; критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна при сравнении трех и более выборок по количественному признаку. Для оценки корреляционных связей применяли тест Спирмена. Диагностическую информативность экспериментальных иммунотестов определяли с построением ROC-кривой для количественных тестов и стандартным расчетом показателей чувствительности и специфичности для бинарных тестов. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Гуморальный ответ привитых живой чумной вакциной доноров к панели рекомбинантных белков. Иммунореактивность сывороток крови вакцинированных и контрольных доноров оценивали в разработанных нами экспериментальных вариантах ТИФА. Положительно реагирующими считали все разведения сывороток в лунках с сенситинами, оптическая плотность которых превышала в два и более раз таковую в лунках без сенситина.

В группе привитых ЖЧВ (А-Total) методом ТИФА были выявлены антитела ко всем сенситинам из панели (Таблица 1).

Таблица 1 – Частота обнаружения антител к F1, LcrV, Pla, YopM, YopE, YscF у вакцинированных живой чумной вакциной и невакцинированных доноров методом твердофазного иммуноферментного анализа

Группы доноров	Процент положительных ответов (число иммунореактивных сывороток / общее число исследованных сывороток), полученных при тестировании с белками:					
	F1	LcrV	Pla	YopM	YopE	YscF
A-Total	48,5 (16/33)	6,3 (2/32)	35,3 (12/34)	40,6 (13/32)	3,2 (1/31)	50,0 (17/34)
A-RV	64,3 (9/14)	0,0 (0/14)	71,4* (10/14)	21,4 (3/14)	0,0 (0/14)	50,0 (7/14)
A-EV	36,8 (7/19)	11,1 (2/18)	10,0* (2/20)	55,5 (10/18)	5,9 (1/17)	50,0 (10/20)
B	25,0 (4/16)	0,0 (0/16)	100,0 (16/16)	68,8 (11/16)	0,0 (0/16)	56,3 (9/16)

Примечание: выделено жирным шрифтом – частота встречаемости антител достоверно ниже, чем в контрольной группе ($p < 0,05$), тест Фишера; * – частота встречаемости антител достоверно различается в группах A-RV и A-EV, ($p < 0,05$), тест Фишера. A-Total – привитые живой чумной вакциной доноры; A-RV – привитые живой чумной вакциной с длительностью поствакцинального периода < 1 года, A-EV – привитые живой чумной вакциной с длительностью поствакцинального периода > 1 года, B – группа контроля.

Наибольшее число серопозитивных ответов было зарегистрировано к белкам YscF, F1, YopM, и Pla: антитела к ним были обнаружены в одной трети – половине случаев. Специфические иммуноглобулины (Ig) к LcrV и YopE были детектированы только у единичных доноров.

Сравнение распределения серопозитивных ответов к используемым сенситинам в группах A-RV и A-EV показало, что антитела к F1 в 1,7 раз чаще выявлялись у недавно вакцинированных доноров, а сывороточные Ig, специфичные к YopM, наоборот, в 2,6 раза чаще обнаруживались у привитых со сроком поствакцинального периода более года ($p > 0,05$). Антитела к Pla достоверно чаще (в 7 раз) регистрировались в группе A-RV ($p < 0,001$). Частота обнаружения анти-YscF-антител была одинакова в обеих группах и составила половину ответов. Антитела к LcrV и YopE зарегистрированы только в группе A-EV, доля положительных ответов составила менее 12 %.

В контрольной группе B были выявлены антитела к 4 белкам из 6 тестируемых. Все невакцинированные доноры (100 %) были серопозитивны к активатору плазминогена Pla, при этом доля положительных ответов в этой группе достоверно превышала серопозитивные ответы во всех группах вакцинированных ЖЧВ (A-Total: $p < 0,0001$, A-RV: $p < 0,05$, A-EV: $p < 0,0001$). Более 2/3 сывороток невакцинированных доноров давали позитивную реакцию с YopM, более половины – с YscF и только

четверть – с капсульным антигеном F1. Ни один из контрольных доноров не был серопозитивен к LcrV и YopE по данным ТИФА.

Средние геометрические значения титров (СГТ) в группе A-Total регистрировались, в порядке убывания, к YscF > F1 > YopM > Pla; при этом в группе A-RV максимальные СГТ были детектированы к Pla, а в группе A-EV – к YscF. Минимальные СГТ у вакцинированных ЖЧВ доноров были зарегистрированы к LcrV и YopE.

В контрольной группе регистрировались максимальные значения СГТ к Pla, почти в два раза превышающие СГТ к YscF и в три – СГТ к YopM.

Сравнение титров антител к рекомбинантным сенситинам у привитых ЖЧВ с титрами, регистрируемыми в контрольной группе, выявило достоверное повышение уровня антител к F1 в группе A-RV ($p < 0,01$). В то же время титры антител к Pla в группах A-Total, A-RV и A-EV были достоверно ниже, чем в группе контроля ($p < 0,0001$, $p < 0,001$). Во всех остальных случаях титры антител в сравниваемых группах регистрировались в пределах сопоставимых величин.

Таким образом, при исследовании иммунореактивности сывороток привитых ЖЧВ и наивных доноров методом ТИФА была выявлена серопревалентность вакцинированных доноров ко всем 6 исследуемым сенситинам. Доминантный, как по частоте встречаемости, так и по уровню выявляемых антител, гуморальный ответ был зарегистрирован к YscF, F1, YopM и Pla, однако антитела к этим же 4 белкам были выявлены у невакцинированных контрольных доноров. Серопозитивность к Pla и уровни гомологичных антител у последних достоверно превышали аналогичные показатели во всех группах вакцинированных доноров. Характерным для группы недавно вакцинированных доноров было достоверное повышение титров анти-F1-антител. Антитела к LcrV и YopE были зарегистрированы только у привитых ЖЧВ, однако выявлялись у единичных доноров и в минимальных титрах.

В связи с низкой серопревалентностью сывороток крови вакцинированных ЖЧВ доноров к ряду иммунодоминантных белков чумного микроба, было решено провести тестирование сывороток методом ИБ. Большая специфичность и чувствительность ИБ по сравнению с ТИФА была продемонстрирована в ряде работ по оценке постинфекционного и поствакцинального иммунитета к чуме (Девдариани З.Л. с соавт., 1997; Benner G.E. et al., 1999; Neubauer H. et al., 2000).

Как видно из таблицы 2, в группе A-Total регистрировались специфические антитела к рекомбинантному белку F1 – доля серопозитивных доноров составила более 2/3 вакцинированных ЖЧВ. Несколько реже и с одинаковой частотой выявлялись антитела к Pla и YscF, тогда как сывороточные Ig к YopM определялись менее чем у половины доноров. Частота встречаемости антител к LcrV и YopE не превышала 20 %.

Таблица 2 – Частота обнаружения антител к панели рекомбинантных белков у вакцинированных живой чумной вакциной и невакцинированных доноров методом иммуноблоттинга

Группы доноров (n)	Серопозитивность	Панель рекомбинантных сенситинов					
		F1	LcrV	Pla	YopM	YopE	YscF
1. A-Total (n=34)	Абс (%)	26 (76,5)	7 (20,6)	25 (73,5)	15 (44,1)	6 (17,6)	25 (73,5)
	p1-4	<0,01	>0,05	<0,05	>0,05	>0,05	<0,0001
2. A-RV (n=14)	Абс (%)	13 (92,9)	2 (14,3)	10 (71,4)	8 (57,1)	4 (28,6)	14 (100,0)
	p2-4	<0,001	>0,05	<0,05	>0,05	<0,05	<0,0001
3. A-EV (n=20)	Абс (%)	13 (65,0)	5 (25,0)	15 (75,0)	7 (35,0)	2 (10,0)	11 (55,0)
	p3-4	<0,05	>0,05	<0,05	>0,05	>0,05	<0,001
	p2-3	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,01
4. B (n=17)	Абс (%)	5 (29,4)	4 (23,5)	17 (100,0)	6 (35,3)	0 (0,0)	0 (0,0)

Примечание: Тест Фишера. вероятность при сравнении групп: p1-4 –A-Total и B; p2-4 –A-RV и B; p3-4 –A-EV и B; p2-3 –A-RV и A-EV. Жирным шрифтом выделены статистически значимые различия ($p < 0,05$). A-Total – привитые ЖЧВ доноры; A-RV – привитые живой чумной вакциной доноры с длительностью поствакцинального периода < 1 года, A-EV – привитые живой чумной вакциной с длительностью поствакцинального периода > 1 года, B – группа контроля.

В группе A-RV абсолютно во всех пробах были зарегистрированы антитела к YscF и в более чем 90 % случаев – к F1. Частота встречаемости антител к остальным белкам из панели была следующей: более чем 2/3 сывороток были иммунореактивны к Pla, более половины – к YopM, более четверти – к YopE и менее 1/6 – к LcrV. При этом в группе A-EV частота выявления анти-YscF антител достоверно снижалась вдвое ($p < 0,01$), а анти-F1 и анти-YopM иммуноглобулинов – в 1,4 и 1,6 раз, соответственно, однако изменения не были статистически значимыми ($p > 0,05$). Доля позитивных ответов к Pla в группах A-RV и A-EV не различалась. Антитела к YopE у недавно вакцинированных ЖЧВ выявлялись в 2,8 раз чаще, чем у давно вакцинированных доноров, а к LcrV – в 1,7 раз реже.

В контрольной группе B были обнаружены антитела к 4 белкам из 6 тестируемых. Как и при использовании ТИФА, 100 % невакцинированных доноров оказались серопозитивны к Pla. Около трети сывороток реагировали с YopM и F1 и менее четверти – с LcrV. Антител к YopE и YscF методом ИБ в группе контроля не выявлено.

Сравнение частоты выявления антител к рекомбинантным сенситинам между группами вакцинированных ЖЧВ и контрольных доноров показало, что у привитых ЖЧВ доноров достоверно чаще встречались антитела к YscF (A-Total: $p < 0,0001$, A-RV: $p < 0,0001$, A-EV: $p < 0,01$) и F1 (A-Total: $p < 0,01$, A-RV: $p < 0,01$, A-EV: $p < 0,05$), а у невакцинированных доноров – к Pla ($p < 0,05$). Характерным для группы A-RV также было достоверное увеличение позитивных ответов к YopE ($p < 0,05$).

Таким образом, при исследовании методом ИБ максимальное количество серопозитивных ответов среди вакцинированных ЖЧВ было зарегистрировано к YscF, F1 и Pla. При этом антитела к первым двум белкам достоверно чаще выявлялись в группе вакцинированных доноров, а к Pla – в контрольной группе. Частота выявления антител к YopM и LcrV не отличалась между группами привитых и контролем.

Характерным для группы A-RV было достоверное увеличение частоты встречаемости анти-YopE-антител.

Сравнение результатов обоих серологических методов подтвердило полученные нами в ТИФА данные о сероконверсии к F1 в группе A-RV и достоверно значимом снижении антител к Pla в группах привитых ЖЧВ. В целом, метод ИБ в нашем исследовании оказался более информативным, чем ТИФА, и позволял в 1,5–5,5 раз увеличить выявление серопозитивных доноров как среди вакцинированных ЖЧВ, так и среди волонтеров контрольной группы (рисунок 1). Основные тренды в соотношении положительных ответов у вакцинированных и невакцинированных доноров были сохранены при использовании обоих методов для большинства сенситинов из рабочей панели. Максимальные расхождения были получены при исследовании иммунореактивности к YscF: в ТИФА антитела к данному белку были обнаружены у 50 % вакцинированных и контрольных доноров, тогда как в ИБ анти-YscF-антитела выявлялись исключительно у привитых ЖЧВ. Полученные данные позволяют предположить, что специфичными для вакцинированных ЖЧВ были антитела, гомологичные к секвенциальным эпитопам YscF, определяемым методом ИБ, а не к конформационным, чаще выявляемым в ТИФА.

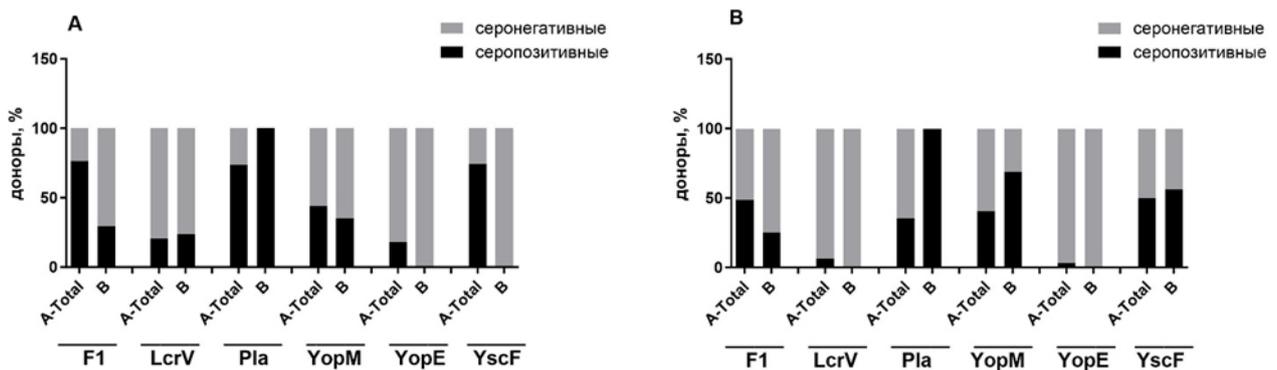


Рисунок 1 – Эффективность выявления в реакциях иммуноблоттинга (А) и твердофазного иммуноферментного анализа (В) доноров, серопозитивных к рекомбинантным белкам F1, LcrV, Pla, YopM, YopE, YscF

Комбинации белков, вовлеченных в гуморальный ответ доноров, вакцинированных живой чумной вакциной. Для оценки разнообразия по количеству белков рабочей панели, вовлеченных в специфическое взаимодействие с индивидуальными сыворотками, использовали результаты ИБ. Установлено, что сыворотки привитых ЖЧВ доноров наиболее часто давали положительную реакцию с 4-мя сенситами одновременно. Этот показатель в 5,9–8,5 раз превышал аналогичный в группе В ($p < 0,001$). Напротив, в группе контроля сыворотки крови чаще всего (в 47,1 % случаев) реагировали только с 1 сенситином из панели, достоверно превышая аналогичный показатель в группах, привитых ЖЧВ ($p < 0,05$). Антительный ответ вакцинированных доноров отличался большим разнообразием и включал как нон-респондеров, так и взаимодействие с 1–5 сенситами.

Анализ комбинаций сенситинов, антитела к которым одновременно выявлялись в ИБ у индивидуального донора, вакцинированного ЖЧВ, показал, что из 49 сочетаний (5 комбинаций сенситинов не встречались ни у одного из доноров) только 7 достоверно чаще определялись в группе A-Total, чем в контрольной группе В. Из них почти у двух третей детектировались специфические антитела к сочетанию F1+YscF, затем, в порядке убывания, были зарегистрированы антитела к комбинациям $Pla+YscF > F1+Pla+YscF > YopM+YscF > F1+YopM+YscF > Pla+YopM+YscF > F1+Pla+YopM+YscF$. В группе A-RV количество комбинаций, антитела к которым достоверно чаще выявлялись по сравнению с наивными донорами, было больше и составило 10 из 39. Среди них так же преобладали антитела к F1+YscF, Pla+YscF, F1+Pla+YscF. Реже и с одинаковой частотой регистрировались специфические Ig к сочетаниям F1+YopM, YopM+YscF, F1+YopM+YscF (более половины наблюдений) и Pla+YopM+YscF и F1+Pla+YopM+YscF (около трети наблюдений). Особенностью структуры антительного ответа у недавно вакцинированных ЖЧВ лиц было включение в маркерные комбинации белка YopE – антитела к сочетанию F1+YopE и YopE+YscF обнаруживались более чем у четверти доноров. В группе A-EV достоверное по сравнению с контролем превышение частоты встречаемости антител наблюдалось только к 3-м комбинациям белков: F1+YscF, Pla+YscF и F1+Pla+YscF.

Определение диагностической информативности экспериментальных тестов на основе рекомбинантных сенситинов для оценки качества поствакцинального иммунного ответа. Оценку параметров диагностической информативности разработанных экспериментальных иммунотестов на основе ТИФА и ИБ с панелью рекомбинантных сенситинов проводили в рамках выборки группы A-RV в сравнении с группой В. Диагностическую информативность определения титров анти-F1-антител в экспериментальном варианте ТИФА оценивали посредством построения характеристической ROC-кривой (рисунк 2). Результаты анализа полученной ROC-кривой позволили оценить прогностическую силу рассматриваемого теста как хорошую ($AUC = 0,7338 \pm 0,0947$) для дифференциации недавно привитых ЖЧВ доноров от наивных. Пороговое значение обратных титров антител, выявляемых в ТИФА с учетом максимального индекса Юдена, составило 150. Хотя рассчитанная в этом случае специфичность теста была абсолютной (100 %), чувствительность оказалась относительно низкой и составила всего 42,86 %.

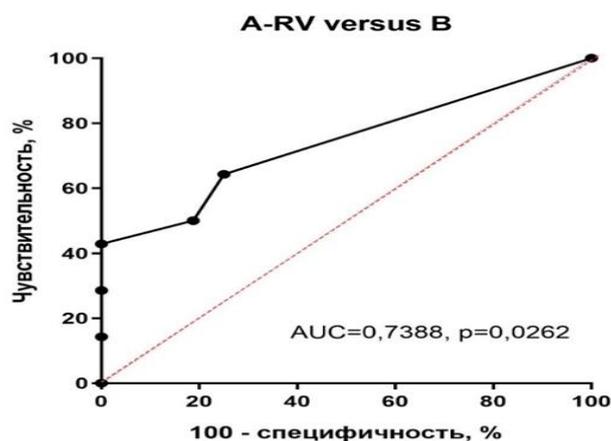


Рисунок 2 – Определение показателей диагностической информативности выявления антикапсульных антител в экспериментальном твердофазном иммуноферментном анализе в сыворотках крови доноров, вакцинированных живой чумной вакциной, со сроком поствакцинального периода менее 1 года (группа А-RV)

Показатели диагностической информативности определения специфических антител в сыворотках крови доноров группы А-RV методом ИБ представлены в *таблице 3*.

Таблица 3 – Характеристики чувствительности и специфичности твердофазного иммуноферментного анализа и иммуноблоттинга при тестировании сывороток крови привитых живой чумной вакциной и контрольных доноров

Сенситины	Чувствительность, (95 % ДИ)	Специфичность, (95 % ДИ)	p
F1	92,86 % (68,53 – 99,63)	70,59 % (46,87 – 86,72)	0,0007
LcrV	нп	нп	p>0,05
Pla	71,43 % (45,35 – 88,28)	0,00 % (0,00 -18,43)	0,0318
YopM	нп	нп	p>0,05
YopE	28,57 % (11,72 - 54,65)	100,00 % (81,57 - 100,00)	0,0318
YscF	100,00 % (78,47 -100,00)	100,00 % (81,57 – 100,00)	<0,0001

Примечание: нп – неприменимо, ввиду p>0,05. ДИ – доверительный интервал.

Определение специфических антител методом ИБ с использованием в качестве сенситинов YopE, F1 и YscF позволяло достоверно дифференцировать вакцинированных доноров от наивных с различной информативностью. Детекция антител к Pla оказалась неспецифичной для привитых. Обнаружение анти-YopE антител позволяло выявить недавно привитых ЖЧВ доноров с высокой специфичностью (100,00 %), но низкой чувствительностью (28,57 %), тогда как детекция антикапсульных антител – с высокой чувствительностью (92,86 %), но относительно низкой специфичностью (70,59 %). Максимальные показатели диагностической чувствительности и специфичности в нашей работе имело определение методом ИБ специфических антител к YscF.

Исследование реакций клеточного иммунитета у вакцинированных живой чумной вакциной с применением панели рекомбинантных белков. Анализ митоген- и антиген-индуцированной пролиферации МНК и Th1/Th2/Th17-поляризации ответа у

вакцинированных ЖЧВ доноров (A-RV, n=5, A-EV, n=13; A-Total, n=18) с использованием митогена ConA, препаратов ЖЧВ Yp26 и Yp37 или панели рекомбинантных белков не выявил достоверных различий в уровне пролиферативной активности лимфоцитов между группами привитых ЖЧВ и невакцинированных доноров (n=6). Однако был зафиксирован ряд особенностей клеточных реакций пролиферации, стимулированных исследуемыми препаратами:

- более высокие индексы пролиферации (ИП) были получены в группе недавно вакцинированных доноров при стимуляции как положительными контролями (ConA, Yp26, Yp37), так и рекомбинантными белками, за исключением YscF. Медианное значение ConA- и F1-индуцированных ИП в группе A-RV превышало таковое в группе A-EV в 2 раза ($p>0,05$), Pla- и YopM-индуцированных – в 1,5 раза ($p>0,05$), YopE-индуцированных – в 4 раза ($p<0,05$). При этом YopE-стимулированные ИП в группе A-RV в 3 раза превышали таковые в группе контроля;

- при культивировании с препаратами ЖЧВ Yp26 и Yp37 более высокие ИП были выявлены в ответ на стимуляцию Yp37 (ИП Yp37 > ИП Yp26);

- умеренная пролиферативная активность была зафиксирована при стимуляции F1: медианное значение антиген-индуцированных ИП в группе A-RV составило 3,68 (1,26; 6,98), в группе A-EV – 1,79 (1,02; 3,02), а в контрольной группе B – 2,45 (1,36; 3,10);

- *in vitro* стимуляция МНК привитых и контрольных доноров белками LcrV и YscF не приводила к индукции детектируемой бластной трансформации лимфоцитов: максимальное медианное значение ИП при инкубации в присутствии LcrV было получено в группе A-RV и составило 1,25 (0,95; 3,14), при инкубации с YscF – в группе A-EV (1,82 (0,99; 2,97));

- напротив, высокий уровень пролиферативного ответа был зарегистрирован при стимуляции Pla, YopM и YopE: средние значения ИП лимфоцитов, инкубируемых с указанными белками, в группе A-RV составляли более 5,0 и превышали таковые, полученные в ответ на стимуляцию одним из «положительных контролей» – Yp26.

Полученные результаты позволяют предположить интенсификацию процессов бластной трансформации в ответ на ре-стимуляцию рекомбинантными белками YopE, Pla, YopM и F1, а также митогеном ConA в течение года после введения ЖЧВ.

Спонтанная продукция цитокинов. Исследование спонтанной продукции цитокинов показало, что в отсутствие антигенной стимуляции продукция IFN- γ была минимальной и не различалась у вакцинированных ЖЧВ и контрольных доноров. Спонтанно продуцируемые уровни IL-17A, TNF- α , IL-10 колебались в широких диапазонах, однако разница между группами не была статистически значимой ($p>0,05$). В то же время спонтанная продукция IL-4 в группах, вакцинированных ЖЧВ, оказалась достоверно ниже, чем в контрольной группе ($p<0,05$). Не было выявлено корреляции уровня спонтанной секреции исследуемых цитокинов с числом вакцинаций ЖЧВ или количеством лет после последней иммунизации.

Продукция Th1/Th2/Th17-цитокинов в ответ на *in vitro* стимуляцию ConA и цельноклеточными препаратами живой чумной вакцины. Изменение продукции Th1/Th2/Th17-цитокинов в ответ на активацию контрольными препаратами ЖЧВ и ConA

представлено на *рисунке 3*. У привитых ЖЧВ доноров выявлена специфичная продукция IFN- γ и IL-4 в ответ на стимуляцию ConA, а также IFN- γ и IL-17A при стимуляции препаратами ЖЧВ Yp26 и Yp37. Данные изменения были характерны как для недавно вакцинированных, так и для доноров с длительностью поствакцинального периода более 1 года, и сохранялись у отдельных доноров группы A-EV длительный период (в среднем, 15 лет) после последнего введения вакцины. Способность к активации IFN- γ -секреторной функции клеток у цельноклеточных препаратов ЖЧВ была выше таковой, зарегистрированной с ConA, достигая значимого превышения в группе A-Total ($p < 0,05$). В то же время стимуляция МНК ConA, Yp26 и Yp37 приводила к выраженной, но неспецифической продукции TNF- α и IL-10.

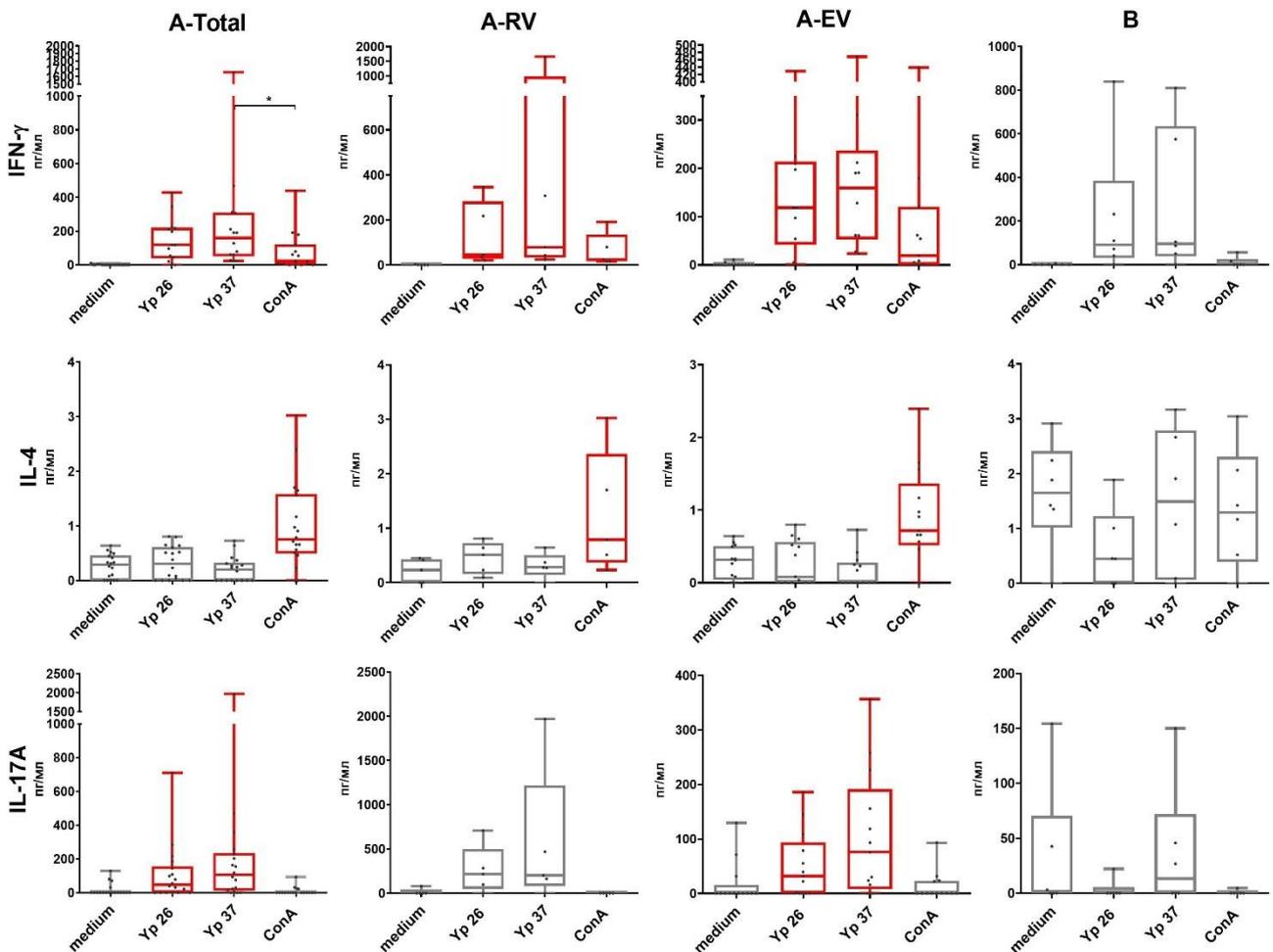


Рисунок 3 – Антиген-индуцированная продукция IFN- γ , IL-4 и IL17-A мононуклеарами периферической крови вакцинированных живой чумной вакциной (A-Total, A-RV, A-EV) и контрольных (B) доноров в ответ на стимуляцию коммерческим митогеном ConA и инактивированными взвесями Yp26 и Yp37

Примечание: на диаграмме размаха указаны Min и Max значения выборки, первый и третий квартили (границы бокса), медиана (горизонтальная линия внутри бокса). Красным цветом выделены показатели, достоверно отличающиеся от уровня цитокина, спонтанно продуцируемого не стимулированными клетками (medium) ($p < 0,05$), критерий Вилкоксона. Сравнение уровней продукции, индуцируемой разными иммуногенами в пределах одной группы доноров, проводили тестом Манна-Уитни (2 белка) или тестом Краскела-Уоллиса с критерием Данна (3 и более белка), * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$, **** – $p < 0,0001$

Продукция Th1/Th2/Th17-цитокинов в ответ на *in vitro* стимуляцию рекомбинантными белками. Анализ антиген-индуцированных концентраций IFN- γ , IL-4, IL-17A, TNF- α , IL-10 в ответ на стимуляцию рекомбинантными F1, LcrV, Pla, YopM, YopE и YscF у вакцинированных ЖЧВ и контрольных доноров показал специфичное для привитых ЖЧВ усиление синтеза IFN- γ , IL-4 и IL-17A. При этом использованные иммуногены в разной степени были вовлечены в индукцию секреции Th1/Th2/Th17 цитокинов (рисунк 4).

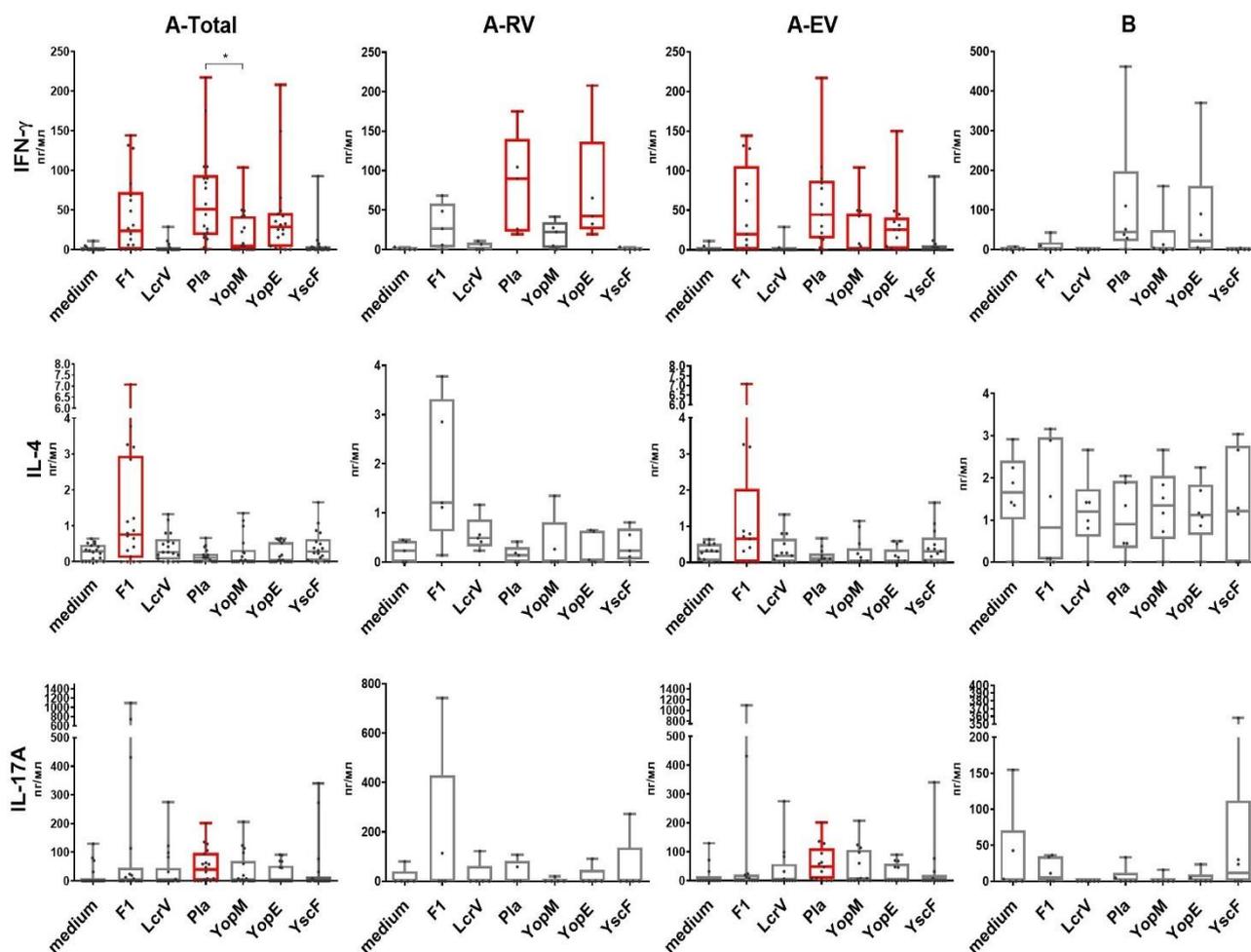


Рисунок 4 – Антиген-индуцированная продукция IFN- γ , IL-4, IL-17A мононуклеарами периферической крови вакцинированных живой чумной вакциной (A-Total, A-RV, A-EV) и контрольных (B) доноров в ответ на стимуляцию рекомбинантными белками F1, LcrV, Pla, YopM, YopE и YscF.

Примечание: см. рисунок 3.

Продукция IFN- γ в группе A-Total достоверно возросла в ответ на стимуляцию F1 ($p=0,0007$), Pla ($p<0,0001$), YopM ($p=0,0020$) и YopE ($p<0,0001$). В группе A-RV все 4 рекомбинантных белка вызывали выраженное нарастание уровня цитокина, однако статистической значимости изменения достигали только при стимуляции Pla и YopE ($p=0,0431$). В группе A-EV значимое изменение секреции IFN- γ вызывали все перечисленные белки [F1 ($p=0,0078$), Pla ($p=0,0005$), YopM ($p=0,0313$), YopE ($p=0,0020$)]. Культивирование МНК с LcrV и YscF не влияло на продукцию IFN- γ ни в одной из групп доноров.

Секреция IL-4 достоверно возрастала у привитых ЖЧВ доноров при стимуляции только рекомбинантным F1. В среднем, у привитых доноров (A-Total) F1-индуцированный уровень IL-4 увеличивался в 2,6 раз ($p=0,0018$), в группе A-RV - в 5,6 раз ($p>0,05$), а в группе A-EV – в 2,1 раза ($p=0,0337$).

Продукция IL-17A у вакцинированных ЖЧВ доноров достоверно увеличивалась в ответ на стимуляцию Pla в группе A-Total ($p=0,0245$) и в группе A-EV ($p=0,0186$), тогда как в группе A-RV Pla-индуцированная секреция IL-17A изменялась незначительно ($p>0,05$).

Культивирование МНК с панелью рекомбинантных белков выявило выраженные изменения секреции TNF- α и IL-10 у вакцинированных ЖЧВ и контрольных доноров, однако не все из них носили специфический характер (рисунк 5).

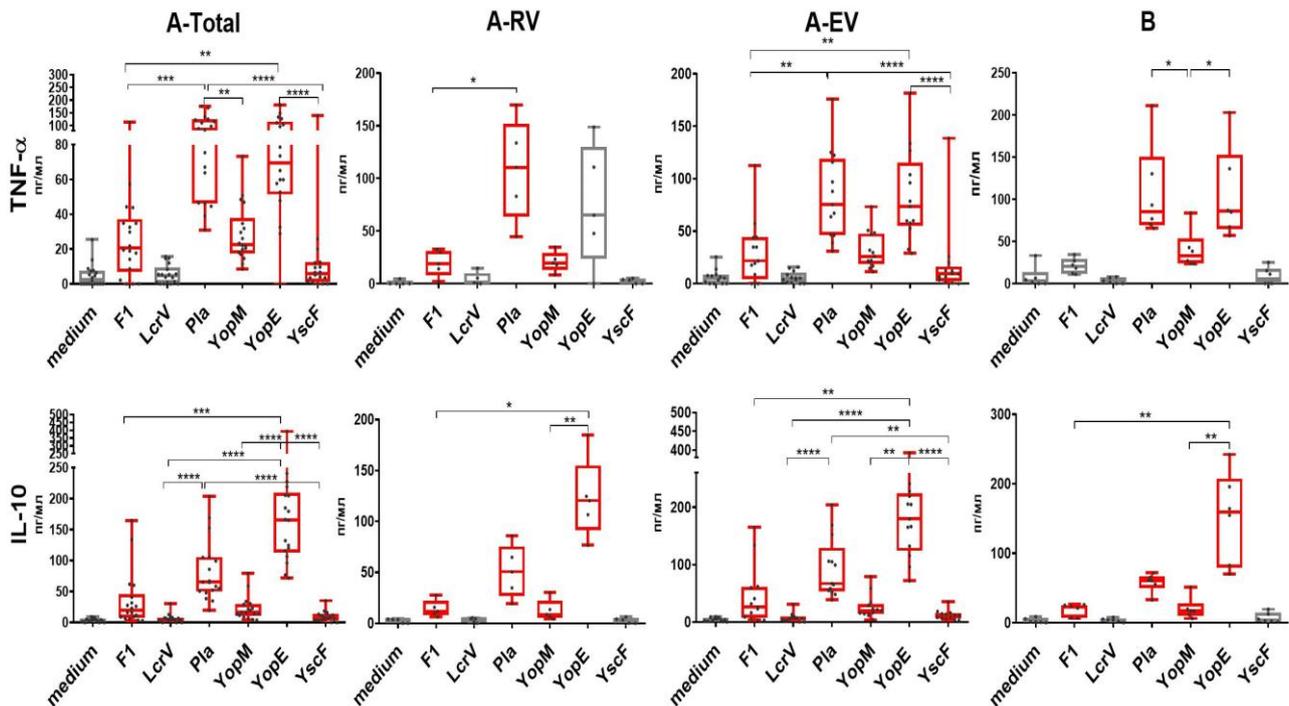


Рисунок 5 - Антиген-индуцированная продукция TNF- α , IL-10 мононуклеарами периферической крови вакцинированных живой чумной вакциной (A-Total, A-RV, A-EV) и контрольных (B) доноров в ответ на стимуляцию рекомбинантными белками F1, LcrV, Pla, YopM, YopE и YscF. Примечание: см. рисунок 3.

Секреция TNF- α специфически возрастала у привитых ЖЧВ доноров при стимуляции МНК белками F1 и YscF. В среднем (A-Total), F1- и YscF-индуцированный уровень цитокина увеличивался по сравнению со спонтанной продукцией в 7,9 ($p=0,0003$) и 4,1 раза ($p=0,0076$), соответственно. Значимое увеличение F1-стимулированной продукции TNF- α наблюдалось в группе A-RV ($p=0,0431$) и A-EV ($p=0,0049$), YscF-стимулированной – в группе A-EV ($p=0,0171$). Напротив, культивирование МНК с рекомбинантными Pla, YopM и YopE индуцировало достоверное увеличение секреции TNF- α как у привитых, так и у контрольных доноров ($p<0,05$). Однако достоверных различий в антиген-индуцированных уровнях цитокина между вакцинированными ЖЧВ и наивными донорами не выявлено ($p>0,05$). Способность к индукции синтеза цитокина была в большей степени выражена у Pla и

YopE, в меньшей – у YopM, F1 и YscF ($p < 0,05$). Стимуляция МНК доноров LcrV не влияла на продукцию TNF- α .

Продукция IL-10 специфически увеличивалась у привитых ЖЧВ при стимуляции белками LcrV и YscF. В группе A-Total LcrV- и YscF-индуцированный уровень цитокина увеличивался по сравнению со спонтанной продукцией в 1,3 ($p = 0,0181$) и 1,8 раза ($p = 0,0002$), соответственно, в группе A-EV – в 1,8 ($p = 0,0425$) и 2,9 раз ($p = 0,0005$). Однако в группе A-RV изменения антиген-индуцированных уровней были незначительными ($p > 0,05$). Культивирование с другими белками из панели приводило к статистически значимому ($p < 0,05$), но неспецифическому усилению продукции IL-10 ($p > 0,05$). Способность к индукции синтеза IL-10 была более выражена у YopE и Pla, менее – у F1, YopM, YscF и LcrV ($p < 0,05$).

Таким образом, нами установлена поляризация иммунного ответа у привитых ЖЧВ по смешанному, Th1/Th2/Th17-типу. Специфическими маркерами поствакцинального ответа у вакцинированных ЖЧВ являлось усиление продукции: i) Th1-цитокинов при стимуляции МНК белками F1 (IFN- γ , TNF- α), Pla, YopM, YopE (IFN- γ) и YscF (TNF- α), ii) Th2-цитокинов в ответ на стимуляцию белками F1 (IL-4), LcrV и YscF (IL-10), iii) Th-17-цитокинов в ответ на стимуляцию МНК Pla (IL-17A). Указанные реакции носят долговременный характер и выявляются даже у доноров группы A-EV, в среднем, через 15 лет после последней вакцинации ЖЧВ.

ВЫВОДЫ

1. При исследовании иммунореактивности сывороток крови как вакцинированных привитых живой чумной вакциной, так и контрольных наивных доноров обнаруживаются положительные реакции сывороточных антител с большинством исследуемых рекомбинантных белков, однако для привитых характерно большее разнообразие антительного ответа, выраженное в более частом (в 5,9–8,5 раз) выявлении антител к комбинациям 4 различных сенситинов в индивидуальной сыворотке, а также в наличии нон-респондеров.

2. Маркерами гуморального ответа у привитых живой чумной вакциной доноров, выявляемыми с применением твердофазного иммуноферментного анализа, являются: повышение титров антител к F1 в группе недавно вакцинированных доноров и снижение частоты встречаемости и титров антител к Pla у привитых живой чумной вакциной независимо от срока последней иммунизации, в иммуноблоте – высокая серопревалентность к YscF (55,0–100,0 %), к YopE (28,6 %) у недавно вакцинированных доноров и низкая – к Pla, независимо от длительности поствакцинального периода; длительное (в среднем, 15 лет после последней иммунизации) сохранение специфических антител к F1 и YscF.

3. У привитых живой чумной вакциной доноров клеточный иммунный ответ развивается по смешанному, Th1/Th2/Th17-типу, при этом маркерами клеточных реакций поствакцинального иммунного ответа является усиление продукции мононуклеарными клетками периферической крови Th1-цитокинов при стимуляции белками F1 (IFN- γ , TNF- α), Pla, YopM, YopE (IFN- γ) и YscF (TNF- α), продукции Th2-

цитокинов в ответ на стимуляцию белками F1 (IL-4), LcrV и YscF (IL-10) и синтеза Th-17-цитокинов (IL-17A) в ответ на стимуляцию белком Pla.

4. Выявленные клеточные реакции иммунитета носят долговременный характер, сохраняются спустя, в среднем, 15 лет (2–30 лет) после последней вакцинации и могут быть использованы для разработки и совершенствования методов оценки качества поствакцинального иммунитета, индуцированного живой чумной вакциной.

5. Экспериментальные иммунотесты на основе рекомбинантных белков пригодны для оценки качества иммунного ответа, индуцированного живой чумной вакциной.

6. Диагностическая информативность экспериментальных иммунотестов на основе иммуноблоттинга с использованием в качестве сенситинов рекомбинантных F1 и YscF, выраженная в специфичности и чувствительности теста, составила 70,59 % и 92,86 % и 100 % и 100 %, соответственно; на основе твердофазного иммуноферментного анализа и рекомбинантного F1 – 100 % и 42,86 %.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Проведение серологического мониторинга вакциноиндуцированного иммунного ответа у привитых живой чумной вакциной рекомендуется осуществлять с использованием расширенной панели рекомбинантных сенситинов, включающей такие иммуногены, как капсульный антиген F1, структурный компонент инжектосомы YscF, белок-эффектор системы секреции III типа YopE и активатор плазминогена Pla.

2. В качестве серологических тестов предпочтительно использовать метод иммуноблоттинга, позволяющий увеличить выявление серопозитивных доноров в 1,5–5,5 раз.

3. При исследовании реакций клеточного иммунитета у привитых живой чумной вакциной оценку продукции Th1-цитокинов целесообразно проводить путем *in vitro* стимуляции мононуклеаров периферической крови такими белками, как F1, Pla, YopM, YopE и YscF, продукции Th2-цитокинов – F1, LcrV и YscF, Th17-цитокинов – Pla.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ и/или индексируемых в международных базах данных WoS и Scopus:

1. Humoral and cellular immune responses to *Yersinia pestis* Pla antigen in humans immunized with live plague vaccine / V.A. Feodorova, **A.M. Lyapina**, M.A. Khizhnyakova, S.S. Zaitsev, L.V. Sayapina, T.E. Arseneva, A.L. Trukhachev, S.A. Lebedeva, M.V. Telepnev, O.V. Ulianova, E.P. Lyapina, S.S. Ulyanov, V.L. Motin // PLoS Negl Trop Dis. – 2018. – Vol. 12 (6). – P. e0006511. (Q1, IF WoS (JCR) – 4.487, IF Scopus (SJR) – 2.669).

2. New Promising Targets for Synthetic Omptin-Based Peptide Vaccine against Gram-Negative Pathogens / V.A. Feodorova, **A.M. Lyapina**, S.S. Zaitsev, M.A. Khizhnyakova, L.V. Sayapina, O.V. Ulianova, S.S. Ulyanov, V.L. Motin // Vaccines (Basel). – 2019. – Vol. 7 (2). – P. 36. (Q1, IF WoS (JCR) – 4.086, IF Scopus (SJR) – 1.743).

3. *Yersinia pestis* Antigen F1 but Not LcrV Induced Humoral and Cellular Immune Responses in Humans Immunized with Live Plague Vaccine - Comparison of Immunoinformatic and Immunological Approaches / V.A. Feodorova, **A.M. Lyapina**, M.A. Khizhnyakova, S.S. Zaitsev, Y.V. Saltykov, V.L. Motin // Vaccines (Basel). – 2020. – Vol. 8 (4). – P. 698. (Q2, WoS IF (JCR) – 4.422, IF Scopus (SJR) – 1.296).

Публикации в других изданиях:

4. **Ляпина, А.М.** Перспектива использования рекомбинантных белков в фундаментальной науке и вакцинологии / А.М. Ляпина // Молодые ученые – здравоохранению региона: материалы 70 науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых Саратовского гос. мед. университета. – Саратов, 2009. – С. 438–439.

5. Гуморальный ответ к антигенам чумного микроба у доноров, вакцинированных живой чумной вакциной EV НИИЭГ / **А.М. Ляпина**, В.А. Федорова, М.В. Телепнев, О.В. Ульянова, Ю.Ю. Елисеев, В.Л. Мотин // Инфекции, обусловленные иерсиниями: материалы III науч.-практ. конф. с междунар. участием. – Санкт-Петербург, 2011. – С. 80–81.
6. Перспективы применения мультиплексного теста на основе панели рекомбинантных иерсиниозных антигенов - биомаркеров персонифицированной оценки специфического гуморального ответа / **А.М. Ляпина**, В.А. Федорова, М.А. Хижнякова, М.В. Telepnev, О.В. Ульянова, V.L. Motin // Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине: материалы III междунар. науч.-практ. конф. (22–24 нояб. 2012). – Казань, 2012. – С. 371–372.
7. Рекомбинантные полипептиды как биомаркеры оценки иммунологической эффективности вакцинации живой чумной вакциной у людей / **А.М. Ляпина**, В.А. Федорова, М.А. Хижнякова, М.В. Телепнев, В.Л. Мотин // Медицинский академический журнал. – 2012. – № 3, Т.12. – С. 85–87.
8. High Potency of Novel Polymeric Adjuvant in Eliciting of the Immune Response in Mice to Major Antigens of Chlamydia and Yersinia / V.A. Feodorova, **A.M. Lyapina**, O.V. Ulianova T.I. Polyanina, Yu.Yu. Eliseev, V.L. Motin // *Procedia in Vaccinology*. – 2012. – Vol. 6. – P. 93–97. (*Q4, IF Scopus (SJR) – 0.163*).
9. Serologic Markers for Long-Term Immunity in Humans Vaccinated with Live Yersinia pestis EV НИИЭГ / V.A. Feodorova, **A.M. Lyapina**, O.V. Ulianova, E.P. Lyapina, L.V. Sayapina, M.N. Lyapin, A.A. Shcherbakov, M.V. Telepnev, V.L. Motin // *Procedia in Vaccinology*. – 2012. – Vol. 6. – P. 10–13. (*Q4, IF Scopus (SJR) – 0.163*).
10. Antibody response in humans immunized with live plague vaccine / V.A. Feodorova, **A.M. Lyapina**, M.A. Khizhnyakova, M.V. Telepnev, L.V. Sayapina, O.V. Ulianova, E.P. Lyapina, V.L. Motin // *Yersinia 11: the 11th international symposium on Yersinia (24–28 June 2013)*. – Suzhou, China, 2013. – P. 31.
11. Evaluating human response to live plague vaccine / V.A. Feodorova, **A.M. Lyapina**, M.A. Khizhnyakova, M.A. Khizhnyakova, M.V. Telepnev, E.P. Lyapina, L.V. Sayapina, O.V. Ulianova, T.I. Polyanina, V.L. Motin // *FEMS 2013: Proceeding Book 5th Congress of European Microbiologists (21–25 July, 2013)*. – Leipzig, Germany, 2013. – P. 296.
12. YscF is a Highly Specific Marker for Evaluation of Antibody Response to Live Plague Vaccine in Humans / V.A. Feodorova, **A.M. Lyapina**, M.V. Telepnev, M.A. Khizhnyakova, S.S. Konnova, E.P. Lyapina, L.V. Sayapina, O.V. Ulianova, T.I. Polyanina, V.L. Motin // *Procedia in Vaccinology*. – 2013. – Vol. 7. – P. 44–48. (*Q4, IF Scopus (SJR) – 0.208*).
13. Selectivity in IgG Subclass Response to Live Plague Vaccine in Humans / V.A. Feodorova, M.A. Khizhnyakova, **A.M. Lyapina**, M.V. Telepnev, O.V. Ulianova, E.P. Lyapina, V.L. Motin // *Procedia in Vaccinology*. – 2014. – Vol. 8. – P. 34–37. (*Q4, IF Scopus (SJR) – 0.298*).
14. **Ляпина, А.М.** Характеристика клеточного иммунного ответа к F1 и LcrV доноров, привитых живой чумной вакциной / А.М. Ляпина, В.А. Федорова, В.Л. Мотин // *Российский иммунологический журнал*. – 2015. – Т. 9 (18), № 2 (1). – С. 524–526. (*ИФ РИНЦ – 0,292*).
15. Cellular Immune Response to Pla in Humans Vaccinated with Live Plague Vaccine / V.A. Feodorova, **A.M. Lyapina**, M.A. Khizhnyakova, M.V. Telepnev, E.P. Lyapina, L.V. Sayapina, T.E. Arseneva, I.V. Morozova, A.L. Trukhachev, S.A. Lebedeva, V.L. Motin // *12th International Symposium on Yersinia (25–28 October, 2016)*. – Tbilisi, Georgia, 2016. – P. 46.
16. Characterization of humoral and cellular immune responses to *Yersinia pestis* Pla antigen in humans immunized with live plague vaccine (LPV) / V. Feodorova, M. Khizhnyakova, **A. Lyapina**, S. Zaitsev, M. Telepnev, L. Sayapina, O. Ulianova, S. Ulyanov, T. Arseneva, I. Morozova, A. Trukhachev, S. Lebedeva, E. Lyapina, V. Motin // *FEMS 2017: 7th Congress of European Microbiologists (9–13 July, 2017)*. – Valencia, Spain, 2017. – P. FEMS7–2706.
17. Cellular immune response to T3SS proteins in humans vaccinated with Live Plague Vaccine / **A.M. Lyapina**, V.A. Feodorova, S.S. Zaitsev, M.A. Khizhnyakova, L.V. Sayapina, M.V. Telepnev, O.V. Ulianova, E.P. Lyapina, S.S. Ulyanov, V.L. Motin // *ECI 2018: 5th European Congress of Immunology (2–5 September, 2018)*. – Amsterdam, the Netherlands, 2018. – P.147.

18. Role of Type 3 Secretion System (T3SS) proteins in the induction of short- and long-term immune responses in humans vaccinated with live whole-cell vaccine / V.A. Feodorova, **A.M. Lyapina**, M.A. Khizhnyakova, S.S. Zaitsev, L.V. Sayapina, M.V. Telepnev, O.V. Ulianova, E.P. Lyapina, S.S. Ulyanov, V.L. Motin // 12th Vaccine Congress (16–19 September, 2018). – Budapest, Hungary, 2018. – P. O3.5.
19. T3SS components as the biomarkers of humoral immune response elicited by Live Plague Vaccine in humans / V.A. Feodorova, **A.M. Lyapina**, M.A. Khizhnyakova, S.S. Zaitsev, L.V. Sayapina, M.V. Telepnev, O.V. Ulianova, E.P. Lyapina, S.S. Ulyanov, V.L. Motin // ECI 2018: 5th European Congress of Immunology (2–5 September, 2018). – Amsterdam, the Netherlands, 2018. – P. 47.
20. Immune response to LcrV and F1 in vaccinees immunized with the Live Plague Vaccine / **A.M. Lyapina**, V.A. Feodorova, M.A. Khizhnyakova, L.V. Sayapina, O.V. Ulianova, E.P. Lyapina, S.S. Ulyanov, V.L. Motin // 13th International Symposium on Yersinia (16–19 September, 2019). – Antananarivo, Madagascar, 2019. – P. 92.
21. The role of T3SS effectors in immune response elicited by the Live Plague Vaccine in vaccinees / V.A. Feodorova, **A.M. Lyapina**, M.A. Khizhnyakova, S.S. Zaitsev, L.V. Sayapina, O.V. Ulianova, E.P. Lyapina, S.S. Ulyanov, V.L. Motin // 13th International Symposium on Yersinia (16–19 September, 2019). – Antananarivo, Madagascar, 2019. – P. 93.
22. The role of T3SS effector YopE in adaptive immune response / **A. Lyapina**, V. Feodorova, M. Khizhnyakova, S. Zaitsev, L. Sayapina, M. Telepnev, O. Ulianova, E. Lyapina, S. Ulyanov, V. Motin // FEMS 2019: 8th Congress of European Microbiologists (7–11 July 2019). – Glasgow, Scotland, 2019. – P. 652.
23. B-cell epitope mapping of YscF, a T3SS needle protein of Yersinia spp., with the panel of immune sera from vaccinated models / V.A. Feodorova, **A.M. Lyapina**, M.A. Khizhnyakova, S.S. Zaitsev, E.P. Lyapina, V.L. Motin // FEMS Online Conference on Microbiology (28–31 October 2020). – P. 97.
24. The role of YscF, a T3SS needle protein of Yersinia spp., in vaccine-induced immune response / V.A. Feodorova, **A.M. Lyapina**, M.A. Khizhnyakova, S.S. Zaitsev E.P. Lyapina, V.L. Motin // FEMS Online Conference on Microbiology (28–31 October 2020). – P. 121.
25. Маркерные комбинации антигенов чумного микроба для оценки поствакцинального гуморального иммунитета у привитых живой чумной вакциной доноров / **A.M. Ляпина**, Ю.Ю. Елисеев, В.А. Федорова // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2024. – Т. 13, № 1: Приложение. – С. 230–233.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ЖЧВ	живая чумная вакцина, штамм <i>Y. pestis</i> EV линии НИИЭГ
ИБ	иммуноблоттинг
ИП	индекс пролиферации
ЛПС	липополисахарид
МНК	моноклеарные клетки периферической крови
СГТ	средние геометрические титры
ТИФА	твердофазный иммуноферментный анализ
ConA	concanavalin A from <i>Canavalia ensiformis</i> , митоген
FBS	fetal bovine serum, фетальная сыворотка коров
Ig	иммуноглобулины
NCS	newborn calf serum, сыворотка новорожденного теленка
PBST	фосфатно-солевой буфер, дополненный Tween-20
T3SS	Type Three Secretion System, система секреции третьего типа
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, 3,3',5,5'-тетраметилбензидин
Yp26	бактерии вакцинного штамма ЖЧВ, выращенные при температуре 26°C в течение 48 часов
Yp37	бактерии вакцинного штамма ЖЧВ, выращенные при температуре 26°C в течение 24 часов с последующей инкубацией посевов при 37°C на протяжении 18–24 часов

ЛЯПИНА АННА МИХАЙЛОВНА

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА У ЛЮДЕЙ, ВАКЦИНИРОВАННЫХ ЖИВОЙ
ЧУМНОЙ ВАКЦИНОЙ

3.2.7. Иммунология

3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук