

# ВЫЯВЛЕНИЕ КЛЕТОК ПАМЯТИ У ЕЖЕГОДНО РЕВАКЦИНИРУЕМЫХ ДОНОРОВ ВАКЦИНОЙ СИБИРЕЯЗВЕННОЙ ЖИВОЙ

В.В. Фирстова, А.С. Карцева, М.В. Силкина, М.А. Марьин, Я.О. Мунтян,  
А.К. Рябко, И.Г. Шемякин

ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, п. Оболенск, Россия

**Резюме.** Вакцина сибиреязвенная живая сухая используется для проведения вакцинопрофилактики в России и странах ближнего зарубежья уже в течение нескольких десятилетий. В статье приведены данные об уровне антител к протективному антигену (ПА) и летальному фактору (ЛФ) у многократно вакцинированных доноров в ранние сроки (5–8 сутки) и через 1 месяц после плановой ревакцинации. Проанализировано наличие специфических клеток памяти в крови у доноров после предыдущих вакцинаций. У всех людей через 1 год после иммунизации живой сибиреязвенной вакциной сохраняются Т-лимфоциты памяти. Результаты исследований показали, что на 5–8 сутки после плановой ежегодной ревакцинации в крови у большинства доноров происходило нарастание эффекторных Т-клеток памяти с фенотипом  $CD3^+CD45RO^+CD62L^-$ . Максимальное увеличение эффекторных Т-клеток памяти в крови наблюдали на 7 сутки, когда количество данной субпопуляции увеличивалось в 2 раза по сравнению с контрольной группой доноров. Количество центральных Т-лимфоцитов памяти в крови в ранние сроки после вакцинации не увеличивалось, но внутри этой субпопуляции возрастало количество активированных  $CD3^+CD45RO^+CD62L^+HLA-DR^+$  центральных клеток памяти. Выявили также увеличение содержания активированных  $CD3^+CD45RO^+CD62L^-HLA-DR^+$  клеток в субпопуляции эффекторных клеток памяти. У половины доноров на 5–8 сутки после плановой ежегодной ревакцинации в сыворотке крови были выявлены антитела класса IgG к ПА и у одного донора — к ЛФ. Быстрое нарастание IgG специфических иммуноглобулинов в крови свидетельствует о сохранении В-лимфоцитов памяти в крови доноров после предыдущей вакцинации. Достоверного увеличения количества  $CD19^+CD27^+$  лимфоцитов памяти в крови людей после их вакцинации против сибирской язвы обнаружено не было, но прослеживалась тенденция к увеличению количества  $CD19^+CD27^+$  клеток памяти в крови на 5–8 сутки после вакцинации против сибирской язвы. После вакцинации на 5–8 сутки иммуногенеза активировалась как субпопуляция Т-хелперов, так и субпопуляция цитотоксических лимфоцитов, на поверхности которых усиливалась экспрессия CD69 и/или CD25 молекул. Т-хелперы усиливали экспрессию преимущественно CD25 молекулы, что отражает их высокую пролиферативную активность, а цитотоксические лимфоциты — CD69 молекулу, появление которой свидетельствует об усилении функциональной активности клеток. Наличие антител к ПА коррелирует с защитой организма от сибиреязвенной инфекции, что подтверждено в ряде экспериментов на животных моделях. К сожалению, уровень антител к ПА в крови людей быстро снижается

**Адрес для переписки:**

Карцева Алена Сергеевна  
142279, Россия, Московская область, Серпуховский район,  
п. Оболенск, ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии.  
Тел.: 8 (4967) 31-20-84. Факс: 8 (4967) 36-00-10.  
E-mail: pinchuk@obolensk.org

**Contacts:**

Alena S. Kartseva  
142279, Russian Federation, Moscow Region, Serpukhov District,  
Obolensk, State Research Center of Applied Microbiology  
and Biotechnology.  
Phone: +7 (4967) 31-20-84. Fax: +7 (4967) 36-00-10.  
E-mail: pinchuk@obolensk.org

**Библиографическое описание:**

Фирстова В.В., Карцева А.С., Силкина М.В., Марьин М.А.,  
Мунтян Я.О., Рябко А.К., Шемякин И.Г. Выявление клеток памяти  
у ежегодно ревакцинируемых доноров вакциной сибиреязвенной  
живой // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 3–4. С. 495–503.  
doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-495-503

**Citation:**

Firstova V.V., Kartseva A.S., Silkina M.V., Marin M.A., Muntian I.A.,  
Ryabko A.K., Shemyakin I.G. Detecting specific memory T and B cells  
in volunteers annually revaccinated with live anthrax vaccine // Russian  
Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9,  
no. 3–4, pp. 495–503. doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-495-503

после вакцинации. Выявленная нами способность В-лимфоцитов памяти быстро запускать синтез специфических антител в ответ на ревакцинацию позволяет предположить возможность оценки противосибирезвенного иммунитета по наличию В- и Т-клеток памяти в крови.

**Ключевые слова:** клетки памяти, сибирская язва, проточная цитометрия, вакцина, антитела, протективный антиген, летальный фактор.

## DETECTING SPECIFIC MEMORY T AND B CELLS IN VOLUNTEERS ANNUALLY REVACCINATED WITH LIVE ANTHRAX VACCINE

Firstova V.V., Kartseva A.S., Silkina M.V., Marin M.A., Muntian Ia.O., Ryabko A.K., Shemyakin I.G.

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation

**Abstract.** Currently, live anthrax vaccine has been used for vaccine prophylaxis in Russia and neighbor countries for several decades, but precise mechanism of post-vaccination protection mechanism remains unclear. Here, we provide data on examining serum antibody level against protective antigen (PA) and lethal factor (LF) in repeatedly vaccinated volunteers at early stage (5–8 days) and 1 month after the performing pre-scheduled annual revaccination. Amount of peripheral blood antigen-specific memory T cells after previous vaccinations was analyzed. It was showed that frequency of CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> memory effector T cells was increased in the majority of volunteers on day 5–8 day after performing pre-scheduled annual revaccination that peaked at day 7 by elevating it by 2-fold compared with the control group. Percentage of anthrax-specific central memory T cells did not increase at early stage after vaccination, whereas amount of activated CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> subset within this memory T cell population was increased. Likewise, percentage of activated CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup> effector memory T cell subset was also increased. Moreover, serum anti-PA IgG were detected on day 5–8 day after pre-scheduled annual revaccination in half of volunteers, whereas anti-LF IgG were found only in a single volunteer. Rapidly elevated amount of serum anthrax-specific IgG antibodies evidences about sustained memory B cell response in peripheral blood samples in volunteers after pre-scheduled annual revaccination. However, percentage of CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> memory B cells was not significantly elevated at early stage after revaccination that tended to increase. Both helper and cytotoxic T cell subsets were activated on day 5–8 after revaccination revealed by upregulated expression of CD69 and/or CD25 markers, with the latter predominantly found on helper T cells, thereby accounting for their high proliferative activity, whereas the former — on cytotoxic T cell subsets. Detection of anti-PA IgG antibodies correlates with protection against anthrax, which was confirmed in animal models. Unfortunately, the level of serum anti-PA IgG antibodies rapidly declines after vaccination. Ability of memory B cells to rapidly trigger production of anthrax-specific antibodies in response to revaccination suggests that anti-anthrax immunity may be evaluated by measuring frequency of peripheral blood anthrax-specific memory B and T cells.

**Key words:** memory cells, anthrax, flow cytometry, vaccine, antibodies, lethal toxin, protective antigen.

## Введение

Сибирская язва относится к особо опасной инфекции, вызываемой грамположительными спорообразующими бактериями *Bacillus anthracis*. Для специфической профилактики сибирской язвы в России и странах ближнего зарубежья используют вакцину сибирезвенную живую сухую. Вакцинация живой сибирезвенной вакциной по профилактическим показаниям осуществляется ежегодно. После иммунизации вакциной сибирезвенной живой сухой у 13% людей специфические антитела не выявляются, и их уровень быстро падает: через 9 месяцев 95% вакцинированных являются серонегативными. Данные ретроспективного анализа показали, что после первой вакцинации против сибирской язвы положительный антраксиновый тест выявлялся у 89–90% людей, после двух-трех вакцинаций — у 87%, а после 4 и более — у 29–32% вакцинированных. В связи с этим возникает вопрос об эффективности многократной вакцинации [1].

В странах дальнего зарубежья для вакцинопрофилактики используют химические вакцины: адсорбированную вакцину AVA — anthrax vaccine absorbed — в США и странах Западной Европы, AVP — anthrax vaccine precipitated — в Англии. Оценку иммунологической эффективности вакцинации AVA или AVP вакцинами проводят на основании выявления антител к протективному антигену (ПА) и их способности нейтрализовать летальный фактор (ЛФ). После иммунизации AVA вакциной у 17,6% вакцинированных людей не выявляются IgG антитела к ПА в ИФА, а у 30,9% серопозитивных доноров сыворотки не способны нейтрализовать летальный токсин. Аналогичные данные получены после вакцинации AVP вакциной [5].

У переболевших сибирской язвой людей специфические антитела также долго не циркулируют в крови — максимум 18 месяцев, и преимущественно это антитела к ЛФ [3].

Ряд экспериментальных исследований, проведенных на животных, свидетельствует о важности роли и Т- и В-клеточного звеньев имму-

нитета. В частности, в экспериментах на мышах и приматах была выявлена прямая корреляция между наличием в сыворотке крови токсин-нейтрализующих антител и защитой животных от летального исхода при сибиреязвенной инфекции [16]. Кроме того, у всех выживших людей после террористической атаки в 2011 г. в США в сыворотке крови были обнаружены антитела к ПА [4].

Длительные наблюдения показали, что в эндемичных районах повторная реинфекция сибирской язвой людей не случается, если в их крови циркулируют специфические CD4<sup>+</sup> Т-клетки памяти даже при отсутствии специфических антител в сыворотке крови [2]. Исследования на морских свинках показали, что для защиты от сибирской язвы достаточно наличия пула поствакцинальных/постинфекционных специфических CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти [11].

При расчете сроков ревакцинации обычно выбирают усредненные данные и учитывают гетерогенность людей по силе иммунологических реакций. Это позволило нам предположить, что у части доноров через год после вакцинации еще сохраняются клетки памяти к антигенам *B. anthracis*. Основная ниша клеток памяти — костный мозг и лимфоидные органы. В крови специфические клетки памяти циркулируют постоянно, но в единичных количествах для возможности быстрого выявления патогена в случае его повторного проникновения в организм. При проникновении специфического антигена клетки памяти активируются и их количество увеличивается.

Цель исследования — выявить Т- и В-клетки памяти у ежегодно ревакцинируемых доноров вакциной сибиреязвенной живой.

## Материалы и методы

**Доноры.** У 8 людей, иммунизированных вакциной сибиреязвенной живой сухой для подкожного и скарификационного применения (серия 265, Киров), на 5, 6, 7, 8 и 30 сутки брали цельную кровь в вакуумные пробирки Vacuette (Greiner Bio-One, Австрия) с лития гепарином и с активатором свертывания крови для получения сыворотки. Контрольная группа состояла из 15 доноров неиммунизированных и ранее не болевших сибирской язвой.

**Выделение мононуклеарных клеток.** Гепаринизированную кровь, разведенную в 2 раза фосфатно-солевым буфером (ФСБ) с 2% фетальной бычьей сывороткой (ФБС), наслаивали на градиент плотности Histopaque-1,077 (Sigma, США) в соотношении 1:1, центрифугировали в течении 30 мин при 400g при комнатной температуре. Отобранное опалесцирующее кольцо дважды отмывали при 250g в 10 мл ФСБ

с 2% ФБС. Осадок ресуспендировали в полной питательной среде RPMI 1640 (ПанЭко, Россия), содержащей 10% ФБС, 2 мМ глутамин (ПанЭко, Россия), 10 мМ HEPES (Sigma, США), 25 мкМ 2-меркаптоэтанола (Sigma, США). Жизнеспособность клеток определяли в тесте с трипановым синим. Концентрацию клеточной суспензии доводили до  $5 \times 10^6$  клеток/мл с помощью автоматического счетчика TC-20 (Bio-Rad, США).

**Фенотипирование лимфоцитов.** Лимфоцитарную взвесь клеток ( $5 \times 10^6$  кл/мл) метили моноклональными антителами: для выявления субпопуляций Т-клеток — CD45RO-FITC, CD62L-APC, HLA-DR-PE, CD3-PerCP, CD4-PE, CD25-APC, CD69-FITC, для В-клеток — CD19-APC, CD138-FITC, CD27-PC5 (все производства eBioscience, США), в течение 20 мин в темноте при температуре 20°C в соответствии с инструкцией производителя. Затем клетки отмывали в ФСБ с 2% ФБС и фиксировали 1% раствором формалина. Цитометрический анализ проводили не позднее, чем через 24 ч. Образцы анализировали на проточном цитофлюориметре FACSAria III (Becton Dickinson, США) с использованием программного обеспечения BD FACSDiva (версия 8.0). В каждом образце анализировали 10 000 клеток.

**Получение рекомбинантных антигенов.** Нуклеотидные последовательности ПА и ЛФ были получены амплификацией соответствующих участков генома *B. anthracis* СТИ-1 (ГКПМ-Оболensk, ФБУН ГНЦ ПМБ) парами праймеров, дополнительно содержащих сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции. Полученные фрагменты ДНК были верифицированы в вектор pET22(b)+ (Novagen, Merck, США) и экспрессированы в переплазматическое пространство *E. coli* BL21(DE3), а затем очищены металл-хелатной хроматографией с последующей гель-фильтрацией. Чистоту полученных рекомбинантных белков проверяли в электрофорезе в ПААГ в денатурирующих условиях по методу Лэммли. Гель окрашивали Кумасси бриллиантовым синим (R-250), молекулярную массу полученных полос сравнивали с коммерческим маркером молекулярных масс. Концентрацию определяли на спектрофотометре Smart Spec Plus (Bio-Rad, США) при длине волны 280 нм.

**Определение антител к ПА и ЛФ в сыворотке крови.** В лунки планшета вносили по 100 мкл раствора одного из антигенов в концентрации 0,1 мг/мл, инкубировали в течение 2 ч при температуре 37°C на орбитальном шейкере. По окончании инкубации проводили трехкратную отмывку лунок планшета ФСБ раствором, содержащим 0,05% Tween-20 (ФСБ-Т). Свободные валентности пластика блокировали 5% молоком. Блокировку проводили в течение

1 ч при температуре 37°C и перемешивании, после чего троекратно отмывали с использованием ФСБ-Т. Начиная с разведения 1:25 сыворотки крови вакцинированных людей, титровали с шагом в 2 раза. Далее инкубировали в течение 1 ч при температуре 37°C и перемешивании на шейкере, затем троекратно отмывали ФСБ-Т. Конъюгаты античеловеческих антител с пероксидазой хрена разводили 1:5000. После инкубирования в течении 40 мин при температуре 37°C планшеты шестикратно отмывали ФСБ-Т. Во все лунки вносили по 100 мкл субстрат-индикаторного раствора 3,3',5,5'-тетраметилбензида. Положительную реакцию оценивали по появлению окрашивания раствора в синий цвет. Реакцию останавливали добавлением в лунки по 50 мкл 1 М серной кислоты. Учет результатов проводили на многофункциональном планшетном анализаторе Thermo Scientific Varioskan Flash (Thermo Scientific, США) при длине волны 450 нм. В качестве отрицательного контроля брали сыворотки доноров, невакцинированных против сибирской язвы и не болевших ранее сибиреязвенной инфекцией. Положительным контролем являлась сыворотка мышей линии Balb/c в разведении 1:1000. Положительным считали результат реакции в лунках, оптическая плотность в которых превышает показатели оптической плотности отрицательных контролей не менее чем в 2 раза.

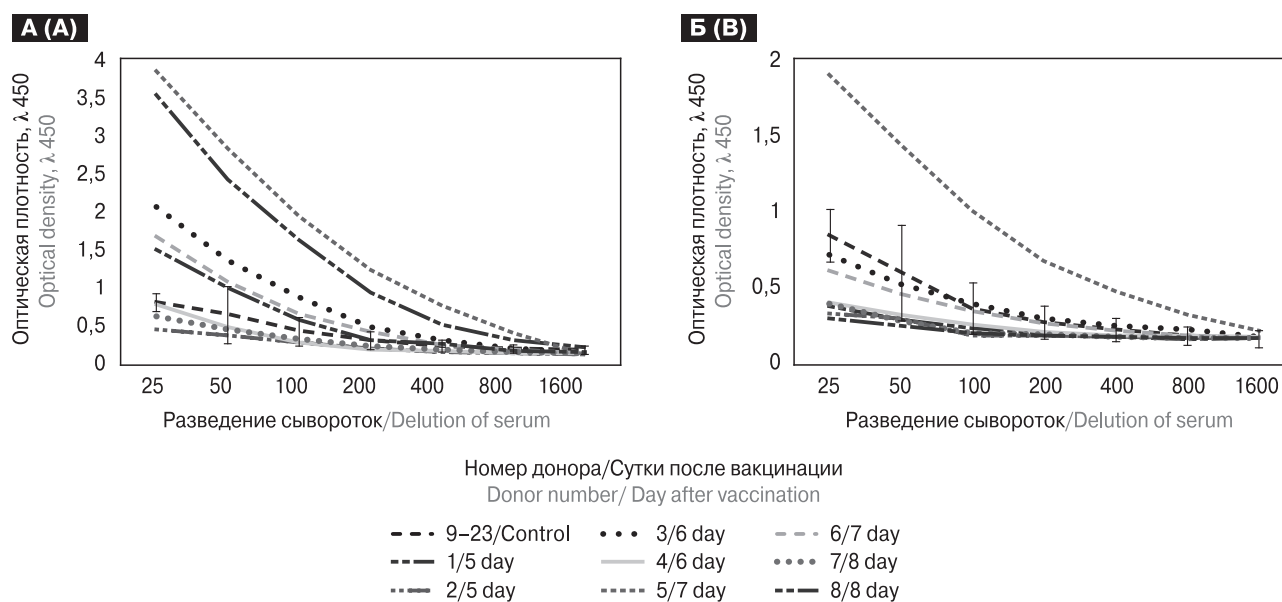
*Статистическая обработка результатов.* Статистическую обработку результатов выполняли с использованием пакета программ Excel

2013. Оценка достоверности различия сравниваемых величин проводилась по критерию Стьюдента (t) и уровню вероятности безошибочного прогноза (P). Цитометрический анализ разных образцов проводили по одинаковому протоколу настроек компенсации и напряжения. Статистический анализ проводили в программе BD FACS Diva (версия 8.0).

## Результаты

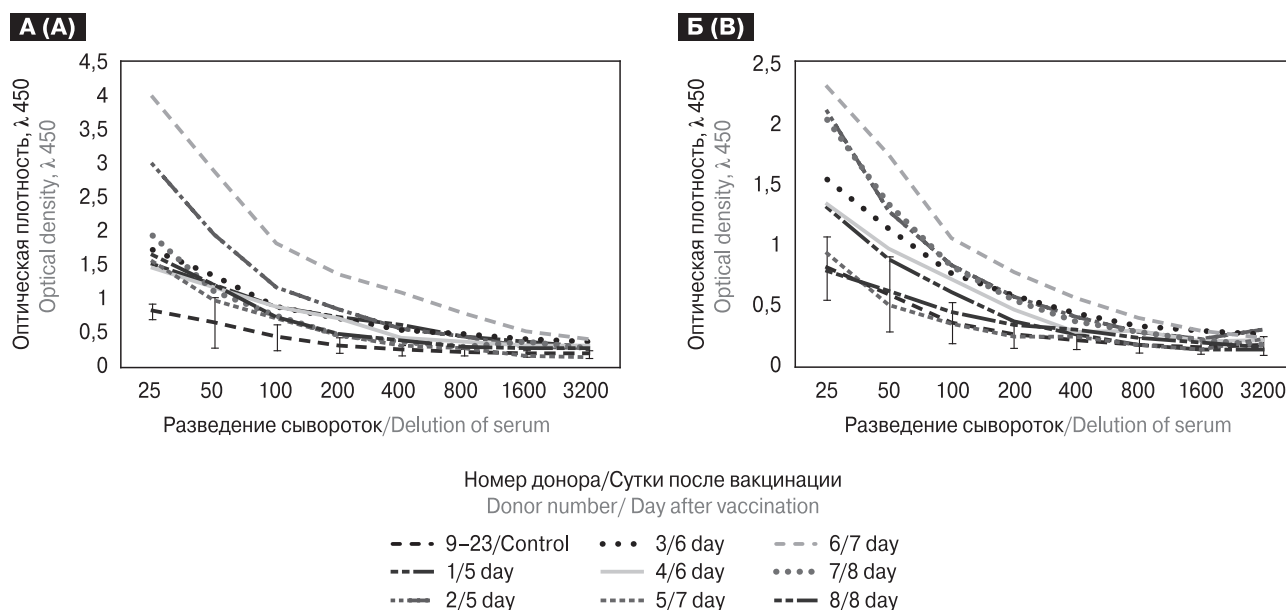
*Определение антител к ПА и ЛФ.* У всех людей, вакцинированных 1 год назад против сибирской язвы в сыворотках крови не были выявлены антитела к ПА и ЛФ (данные не представлены). На 5–8 сутки после плановой ежегодной ревакцинации у четверых из восьми доноров в сыворотках крови были выявлены антитела к ПА. Все серопозитивные доноры были ранее многократно (10–20 раз) вакцинированы против сибирской язвы. Титры антител к ПА варьировали в пределах от 1:50 до 1:400. Серонегативные доноры иммунизировались вакциной живой сибиреязвенной сухой также многократно, а один из них во второй раз. Антитела к ЛФ были выявлены только у одного многократно вакцинированного донора, кровь которого взяли на исследование на 7 сутки после вакцинации (рис. 1).

На 30 сутки после иммунизации у всех доноров в сыворотке крови были выявлены антитела к ПА и у 6 из 8 — антитела к ЛФ. Уровень антител к ПА варьировал от 1:400 до 1600, к ЛФ — от 1:200 до 1:800 (рис. 2).



**Рисунок 1. Титры антител IgG к протективному антигену (А) и летальному фактору (Б) в сыворотке крови доноров на 5–8 сутки после иммунизации вакциной сибиреязвенной живой сухой**

Figure 1. Human serum IgG antibodies to protective antigen (A) and lethal factor (B) on 5–8 days after immunization with live anthrax vaccine



**Рисунок 2. Титры антител IgG к протективному антигену (А) и летальному фактору (Б) в сыворотке крови доноров на 30 сутки после иммунизации вакциной живой сибиреязвенной сухой**

Figure 2. Human serum IgG antibodies to protective antigen (A) and lethal factor (B) on the 30<sup>th</sup> day after immunization with live anthrax vaccine

**Фенотипирование В-лимфоцитов.** Процентное содержание CD19<sup>+</sup> В-лимфоцитов в мононуклеарной фракции крови доноров на 5–8 сутки после иммунизации вакциной сибиреязвенной живой сухой достоверно не отличалось от значений в контрольной группе доноров и колебалось в диапазоне от 6,1 до 9,5% (табл.). Внутри популяции В-лимфоцитов содержание клеток памяти с фенотипом CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> у контрольных

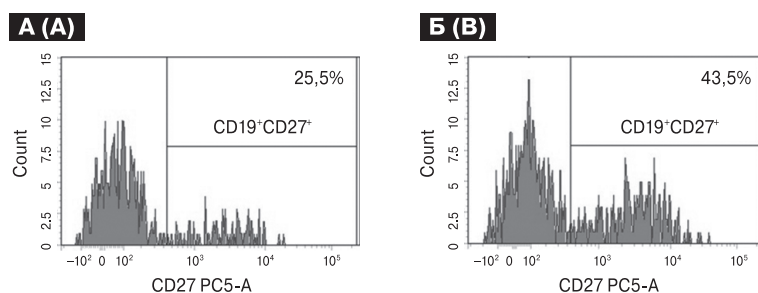
доноров варьировало в пределах от 18,5 до 28,6%. На 6–7 сутки после иммунизации против сибирской язвы у вакцинированных доноров отмечалась тенденция к увеличению CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> субпопуляции (рис. 3).

Процентное содержание CD19<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup> плазматических клеток у доноров контрольной группы колебалось в диапазоне от 0,6 до 1,7%. Мы не обнаружили достоверного увеличения

**Таблица. Процентное содержание В-лимфоцитов и субпопуляций Т-лимфоцитов в периферической крови людей на 5–8 сутки после иммунизации вакциной сибиреязвенной живой сухой**

Table. The percentage of B-lymphocytes and subpopulations of T-lymphocytes in the peripheral blood of people 5–8 days after immunization with live anthrax vaccine

Срок после иммунизации, сутки Period after immunization, day	Контроль Control	5		6		7		8	
Номер донора Donor number	9–23	1	2	3	4	5	6	7	8
CD19 <sup>+</sup>	6,6–10,1	6,1	7,5	9,5	6,7	6,2	7,8	7,0	8,2
CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup>	18,5–28,6	20,9	25,3	43,5	38,5	36,4	41,2	29	34,5
CD19 <sup>+</sup> CD138 <sup>+</sup>	0,6–1,7	4,3	3,0	2,5	2,6	0,9	2,6	1,1	1,6
CD3 <sup>+</sup>	54,5–63,7	63,7	69,2	69,2	64,1	60,4	69,2	76,4	61,7
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	28,2–49,3	56,1	57,7	42,1	34,9	46,6	35,8	48,8	46,9
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	9,6–19,4	18	18	28,5	24,1	16,4	33,6	31,2	15,4
CD3 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> CD62L <sup>-</sup>	8,1–12,0	11,8	17,5	13,9	14,5	25,4	24,1	15,7	16,9
CD3 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> CD62L <sup>-</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	2,5–14,5	10,9	7,8	10,3	9,4	15,1	12,6	14,1	16,2
CD3 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup>	7,0–34,2	28,6	34,1	21,2	25,8	24	50,3	13,8	37,8
CD3 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	3,5–15,0	11,6	14	16	7,7	4,4	13,5	6,2	6,7
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	0,2–0,8	0,2	0,8	0,9	1,9	1,4	6,8	0,3	1,5
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	1,6–3,1	7,3	3,5	3,9	7,4	6,2	3,9	11	6
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	0,3–1,8	3,8	3,2	3,9	4,3	5,7	4,3	0,5	3,1
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	0,2–0,6	2,6	1,4	0,5	1,1	1,6	1,8	0,6	0,5



**Рисунок 3. Пример однопараметрических цитофлюорограмм, отражающих процентное содержание CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> лимфоцитов в крови донора контрольной группы (А) и вакцинированного донора (Б) на 6 сутки после иммунизации вакциной сибиреязвенной живой сухой**

Figure 3. Example of one-parameter cytofluorograms reflecting the percentage of CD19<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> lymphocytes in the blood of the donor of the control group (A) and the vaccinated donor (B) on the 6<sup>th</sup> day after immunization with the live anthrax vaccine

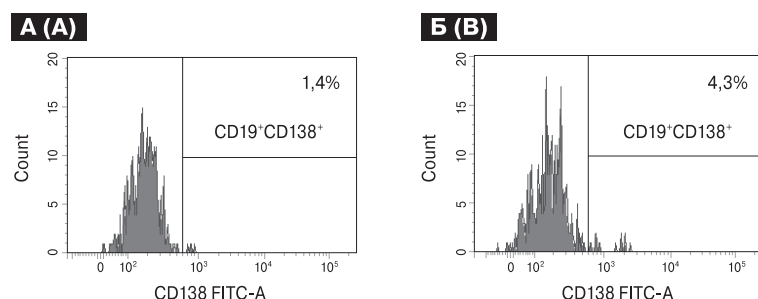
плазматических клеток в крови после вакцинации. Только у одного донора на 5 сутки количество CD19<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup> клеток увеличивалось до 4,3% (рис. 4).

**Фенотипирование Т-клеток памяти.** На основании дифференциальной оценки экспрессии CD45RO и CD62L молекул Т-клетки человека делят на эффекторные и центральные клетки памяти с фенотипами CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> и CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> соответственно [14]. Многопараметрический цитофлюорометрический анализ показал, что на 7 сутки после вакцинации в крови у доноров отмечалось увеличение более чем в 2 раза эффекторных Т-клеток памяти. По экспрессии маркера поздней активации — HLA-DR — судили об активации эффекторных и центральных Т-клеток памяти. Полученные данные показали увеличение субпопуляций активированных центральных Т-клеток памяти (CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) и эффекторных Т-клеток памяти (CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) с 5 по 8 сутки после вакцинации в 2 раза и более по сравнению с контролем (рис. 5).

**Выявление активированных цитотоксических лимфоцитов и Т-хелперов.** По экспрессии молекул CD69 и CD25 определяли количество активированных клеток в субпопуляциях Т-хелперов и цитотоксических лимфоцитов. Во все сроки исследований после вакцинации в крови было выявлено увеличенное количество CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т-хелперов и у некоторых доноров незначительное превышение содержания CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> относительно данных контрольной группы. В субпопуляции цитотоксических лимфоцитов наблюдали увеличение CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> клеток и менее выраженное нарастание CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> лимфоцитов (табл.).

## Обсуждение

Одними из ключевых факторов, обуславливающих иммунопатогенез сибирской язвы, являются ПА и ЛФ — субъективные бинарного летального токсина. Летальный токсин сибирской язвы ингибирует формирование первичных реакций врожденного иммунитета, тем са-



**Рисунок 4. Пример однопараметрических цитофлюорограмм, отражающих процентное содержание CD19<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup> лимфоцитов в крови донора контрольной группы (А) и вакцинированного донора (Б) на 5 сутки после иммунизации вакциной сибиреязвенной живой сухой**

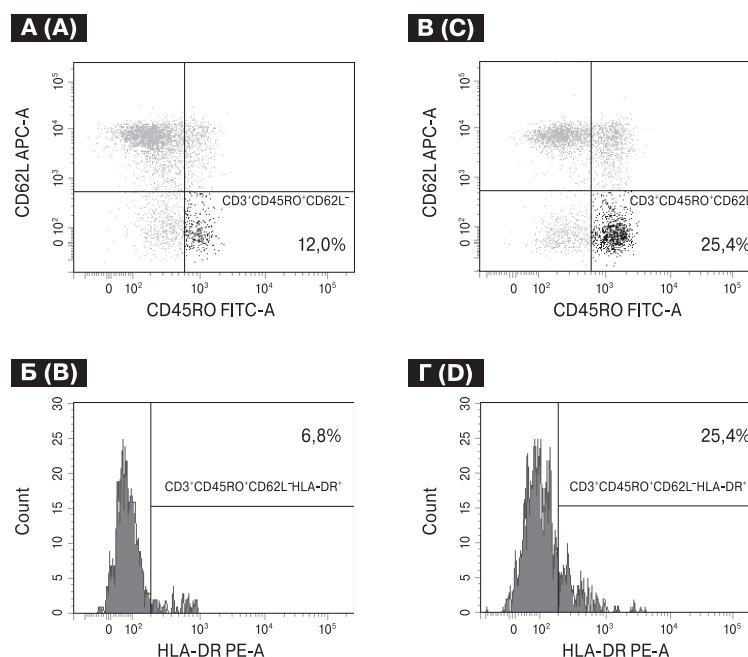
Figure 4. Example of one-parameter cytofluorograms reflecting the percentage of CD19<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup> lymphocytes in the blood of the donor of the control group (A) and the vaccinated donor (B) on the 5<sup>th</sup> day after immunization with the live anthrax vaccine

мым нарушая формирование иммунного ответа. В присутствии летального токсина нарушаются презентация антигена, передачи сигналов Т-клеток и В-клеток, блокируется их пролиферация, запускается апоптоз макрофагов и дендритных клеток. Активация Т-лимфоцитов связана с появлением CD69 и CD25 рецепторов на поверхности клеток. Бактерии *B. anthracis* за счет синтеза ПА и ЛФ ингибируют экспрессию активационных маркеров на поверхности В- и Т-лимфоцитов [12, 6].

Результаты наших исследований показали, что после вакцинации на 5–8 сутки иммуногенеза активируются как субпопуляция Т-хелперов, так и субпопуляция цитотоксических лимфоцитов на поверхности которых усиливается экспрессия CD69 и/или CD25 молекул. Т-хелперы усиливали экспрессию преимущественно CD25 молекулы, что отражает их высокую пролиферативную активность, а цитотоксические лимфоциты — CD69 молекулы, появление которой свидетельствует об усилении функциональной активности клеток. Важность участия Т-лимфоцитарного звена в защите от сибиреязвенной инфекции показана в экспериментах на мышах, у которых спо-

собность Т-лимфоцитов синтезировать  $IFN\gamma$  CD4<sup>+</sup>-клетками под влиянием инактивированных спор *B. anthracis* коррелировала с защитой от сибиреязвенной инфекции даже в отсутствии антител [8]. Появление активированных Т-лимфоцитов в крови доноров в ответ на вакцинацию отражает формирование сибиреязвенного иммунитета, способного обеспечить защиту от последующего заражения [6, 9].

Присутствие Т-клеток, способных быстро активироваться под влиянием антигенов *B. anthracis*, свидетельствует о наличии клеток памяти. Мы попытались выявить увеличение количества клеток памяти и/или усиление ими экспрессии маркеров активации в крови у людей на 5–8 сутки после иммунизации вакциной живой сибиреязвенной сухой. Начиная с 7 суток после вакцинации в крови доноров нарастало количество эффекторных клеток памяти (CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>), которые являются ключевыми в формировании и обеспечении стремительного защитного иммунитета. Распространяясь через кровяное русло по всему организму после проникновения специфического для них антигена, эффекторные Т-клетки памяти регулируют направленность иммунных



**Рисунок 5.** Примеры цитофлюорограмм, отражающих процентное содержание эффекторных клеток памяти в периферической крови у донора контрольной группы (А, Б) и донора на 7 сутки после иммунизации (В, Г)

Figure 5. Examples of cytofluorograms reflecting the percentage of memory effector cells in the peripheral blood of the donor of the control group (A, B) and the donor on the 7<sup>th</sup> day after immunization (C, D)

**Примечание.** А, Б — гистограммы распределения эффекторных клеток памяти и процент активированных внутри субпопуляции CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup> лимфоцитов у донора контрольной группы; В, Г — у донора после иммунизации.

Note. A, B — histograms of the distribution of memory effector cells and the percentage of activated within the subpopulation of CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup> lymphocytes from the donor of the control group; C, D — in the donor after immunization.

реакций, синтезируя соответствующие цитокины. Количество центральных клеток памяти при проникновении специфического антигена может увеличиваться в лимфоидных органах, но основная их функция состоит в активации и усилении пролиферации пула эффекторных клеток памяти. Вероятно, поэтому мы не увидели увеличения в крови количества центральных клеток памяти, но обнаружили увеличение количества среди них активированных клеток, что свидетельствует о взаимодействии со специфическим для них антигеном.

Далее мы попытались выявить В-клетки памяти в крови вакцинированных доноров. По своему фенотипу и функциям В-лимфоциты гетерогенны. Наивные В-лимфоциты экспрессируют CD19 и не экспрессируют CD27 молекулу. После активации В-лимфоциты проходят антигенную дифференцировку и начинают экспрессировать CD27 молекулу. Мы не выявили достоверного увеличения количества CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> лимфоцитов в крови людей после их вакцинации против сибирской язвы, но обнаружили тенденцию к увеличению количества В-лимфоцитов памяти в крови. Мы пытались обнаружить увеличение плазматических клеток в кровотоке. Плазматические клетки, синтезирующие антитела, являются терминальной стадией дифференцировки В-лимфоцитов. Их основное место пребывания — костный мозг и лимфоидные органы. В крови их содержание не превышает 1,5%, и их количество может увеличиваться только транзиторно при миграции в лимфоидные органы и ткани. Плазматические клетки экспрессируют CD138 молекулу (синдекана-1) [13]. В наших исследованиях в изучаемые сроки достоверного увеличения плазматических клеток в крови выявлено не было за исключением одного донора на 5 сутки после вакцинации.

Иммуноферментный анализ сывороток на 5–8 сутки после вакцинации позволил выявить у 4 из 8 вакцинированных доноров IgG антитела к ПА и у одного донора — к ЛФ. Появление антител класса IgG через 5 суток после вакци-

нации свидетельствует о сохранении В-клеток памяти. При наличии В-клеток памяти или плазматических клеток памяти IgG антитела выявляются в сыворотке крови уже на 4–5 день после проникновения специфического антигена, тогда как при первичном попадании антигена в организм необходимо 7–10 дней для детектируемого накопления специфических антител IgG в крови человека [7].

Протективный антиген и ЛФ являются Т-зависимыми антигенами. Можно предположить, что при наличии антител организм будет защищен от сибиреязвенной инфекции даже без участия Т-лимфоцитов, что было показано в экспериментах на животных [10, 16]. Если антитела в сыворотке крови не выявляются, но имеются В-клетки памяти, то для их активации необходимо участие Т-хелперов, которые должны презентировать антиген. А учитывая, что ПА и ЛФ ингибируют активацию Т-клеток, необходимо наличие Т-лимфоцитов памяти, способных активироваться под влиянием антигенов *B. anthracis* и презентировать антигены В-лимфоцитам.

Таким образом, в наших исследованиях было показано, что у всех людей через 1 год после иммунизации живой сибиреязвенной вакциной сохраняются Т-лимфоциты памяти. У четверых из 8 вакцинированных доноров в сыворотке крови обнаруживали антитела к ПА, начиная с 5 суток после вакцинации, что позволяет предположить о сохранении в организме В-лимфоцитов памяти, оставшихся после предыдущей вакцинации. Наличие антител к ПА коррелирует с защитой организма от сибиреязвенной инфекции, что подтверждено в ряде экспериментов на животных моделях. К сожалению, уровень антител к ПА в крови людей быстро снижается после вакцинации. Выявленная нами способность В-лимфоцитов памяти быстро запускать синтез специфических антител в ответ на ревакцинацию позволяет предположить возможность оценки противосибиреязвенного иммунитета по наличию В- и Т-клеток памяти в крови.

## Список литературы/References

1. Маринин Л.И., Дятлов И.А., Мокриевич А.Н., Бахтеева И.В., Белова Е.В., Борзилов А.И., Комбарова Т.И., Кравченко Т.Б., Миронова Р.И., Попова В.М., Сомов А.Н., Титарева Г.М., Тюрин Е.А., Чекан Л.В., Шишкина О.Б., Шишкова Н.А. Методы изучения биологических свойств возбудителя сибирской язвы. М.: ЗАО МП «Гигиена», 2009. 304 с. [Marinin L.I., Dyatlov I.A., Mokrievich A.N., Bakhteeva I.V., Belova E.V., Borzilov A.I., Kombarova T.I., Kravchenko T.B., Mironova R.I., Popova V.M., Somov A.N., Titareva G.M., Tyurin E.A., Chekan L.V., Shishkina O.B., Shishkova N.A. Methods for studying the biological properties of the causative agent of anthrax. Moscow: ZAO MP «Hygiene», 2009. 304 p. (In Russ.)]
2. Ascough S., Ingram R.J., Chu K.K., Reynolds C.J., Musson J.A., Doganay M., Metan G., Ozkul Y., Baillie L., Sriskandan Sh., Moore St., Gallagher T.B., Dyson H., Williamson E.D., Robinson J.H., Maillere B., Boyton R.J., Altmann D.M. Anthrax lethal factor as an immune target in humans and transgenic mice and the impact of HLA polymorphism on CD4<sup>+</sup> T cell immunity. *PLoS Pathog.*, 2014, vol. 10, no. 5: e1004085. doi: 10.1371/journal.ppat.1004085
3. Brenneman K.E., Doganay M., Akmal A., Goldman S., Galloway D.R., Mateczun A.J., Cross A.S., Baillie L.W. The early humoral immune response to Bacillus anthracis toxins in patients infected with cutaneous anthrax. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2011, vol. 62, no. 2, pp. 164–72. doi: 10.1111/j.1574-695X.2011.00800.x.



4. Bush L.M., Perez M.T. The anthrax attacks 10 years later. *Ann. Intern. Med.*, 2012, vol. 156, no. 1, pp. 41–45. doi: 10.7326/0003-4819-155-12-201112200-00373
5. Dumas E.K., Gross T., Larabee J., Pate L., Cuthbertson H., Charlton S., Hallis B., Engler R., Collins L.C., Spooner C.E., Chen H., Ballard J., James J.A., Farris A. Anthrax vaccine precipitated induces edema toxin-neutralizing, edema factor-specific antibodies in human recipients. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2017, vol. 24, no. 11: e00165-17. doi: 10.1128/cvi.00165-17
6. Fang H., Cordoba-Rodriguez R., Lankford C.S.R., Frucht D.M. Anthrax lethal toxin blocks MAPK kinase-dependent IL-2 production in CD4+ T Cells. *J. Immunol.*, 2015, vol. 174, no. 8, pp. 4966–4971. doi: 10.4049/jimmunol.174.8.4966
7. Garman L., Smith K., Farris A., Nelson M., Engler R., James J. Protective antigen-specific memory B cells persist years after anthrax vaccination and correlate with humoral immunity. *Toxins*, 2014, vol. 6, no. 8, pp. 2424–2431. doi: 10.3390/toxins6082424
8. Glomski I.J., Corre J.-P., Mock M., Goossens P.L. Cutting edge: IFN-producing CD4 T lymphocytes mediate spore-induced immunity to capsulated *Bacillus anthracis*. *J. Immunol.*, 2007, vol. 178, no. 5, pp. 2646–2650. doi: 10.4049/jimmunol.178.5.2646
9. Kachura M.A., Hickie C., Kell S.A., Sathe A., Calacsan C., Kiwan R., Hall B., Milley R., Ott G., Coffman R.L., Kanzler H., Campbell J.D. A CpG-ficolin nanoparticle adjuvant for anthrax protective antigen enhances immunogenicity and provides single-immunization protection against inhaled anthrax in monkeys. *J. Immunol.*, 2015, vol. 196, no. 1, pp. 284–297. doi: 10.4049/jimmunol.1501903
10. Kobiler D., Gozes Y., Rosenberg H., Marcus D., Reuveny S., Altboum Z. Efficiency of protection of guinea pigs against infection with *Bacillus anthracis* spores by passive immunization. *Infect. Immun.*, 2002, vol. 70, no. 2, pp. 544–560. doi: 10.1128/iai.70.2.544-550.2002
11. Marcus H., Danieli R., Epstein E., Velan B., Shafferman A., Reuveny S. Contribution of immunological memory to protective immunity conferred by a *Bacillus anthracis* protective antigen-based vaccine. *Infect. Immun.*, 2004, vol. 72, no. 6, pp. 3471–3477. doi: 10.1128/IAI.72.6.3471-3477.2004
12. Paccani S.R., Tonello F., Ghittoni R., Natale M., Muraro L., D’Elios M.M., Tang W.J., Montecucco C., Baldari C.T. Anthrax toxins suppress T lymphocyte activation by disrupting antigen receptor signaling. *J. Exp. Med.*, 2005, vol. 201, no. 3, pp. 325–331. doi: 10.1084/jem.20041557
13. Pauli N.T., Henry Dunand C.J., Wilson P.C. Exploiting human memory B cell heterogeneity for improved vaccine efficacy. *Front. Immunol.*, 2011, vol. 2. doi: 10.3389/fimmu.2011.00077
14. Segundo D.S., Fernandez-Fresnedo G., Gago M., Beares I., Ruiz-Criado J., Gonzalez M., Ruiz-Criado J., Gonzalez M., Ruiz J.C., Gomez-Alamillo C., Lopez-Hoyos M., Arias M. Kidney transplant recipients show an increase in the ratio of T-cell effector memory/central memory as compared to nontransplant recipients on the waiting list. *Transplant. Proc.*, 2010, vol. 42, no. 8, pp. 2877–2879. doi: 10.1016/j.transproceed.2010.07.072
15. Sim B.K.L., Li M., Osorio M., Wu Y., Wai T.T., Peterson J.W., James E.R., Chakravarty S., Gao L., Xu R., Kc N., Stafford R.E., Lawrence W.S., Yeager L.A., Peel J.E., Sivasubramani S.K., Chopra A.K., Filippova S., Hoffman S.L. Protection against inhalation anthrax by immunization with *Salmonella enterica* serovar Typhi Ty21a stably producing protective antigen of *Bacillus anthracis*. *NPJ Vaccines*, 2017, vol. 2, no. 1, pp. 1–7. doi: 10.1038/s41541-017-0018-4
16. Wild M.A., Xin H., Maruyama T., Nolan M.J., Calvey P.M., Malone J.D., Wallance M.R., Bowdish K.S. Human antibodies from immunized donors are protective against anthrax toxin in vivo. *Nat. Biotechnol.*, 2003, vol. 21, no. 11, pp. 1305–1306. doi: 10.1038/nbt89

**Авторы:**

**Фирстова В.В.**, д.б.н., главный научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия;  
**Карцева А.С.**, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия;  
**Силкина М.В.**, стажер-исследователь лаборатории молекулярной биологии ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия;  
**Марин М.А.**, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия;  
**Мунтян Я.О.**, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия;  
**Рябко А.К.**, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия;  
**Шемякин И.Г.**, д.б.н., профессор, зам. директора по научной работе ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия.

**Authors:**

**Firstova V.V.**, PhD, MD (Biology), Head Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;  
**Kartseva A.S.**, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;  
**Silkina M.V.**, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;  
**Marin M.A.**, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;  
**Muntian I.O.**, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;  
**Ryabko A.K.**, Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;  
**Shemyakin I.G.**, PhD, MD (Biology), Professor, Deputy Director of Science, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 11.12.2018  
 Принята к печати 13.03.2019

Received 11.12.2018  
 Accepted 13.03.2019