

**В.В.Фирстова, И.В.Бахтеева, Г.М.Титарева, Е.В.Зырина, С.А.Иванов, Н.В.Киселева,  
П.Х.Копылов, А.П.Анисимов, И.А.Дятлов**

## **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРА РАННЕЙ АКТИВАЦИИ CD69 НА ЛИМФОЦИТАХ ИММУННЫХ МЫШЕЙ ПОСЛЕ СТИМУЛЯЦИИ ИХ АНТИГЕНАМИ ЧУМНОГО МИКРОБА**

*ФГУН ГНЦ Прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск*

В работе дана оценка способности антигенов чумного микроба F1 и V специфически активировать в системе *in vitro* субпопуляции Т-лимфоцитов мышей линии BALB/c, иммунизированных против чумы. В качестве маркера активации лимфоцитов предложено оценивать уровень экспрессии CD69 на поверхности лимфоцитов. Экспрессия раннего маркера активации CD69 в субпопуляциях Т-хелперов и цитотоксических лимфоцитов в ответ на стимуляцию *in vitro* F1 *Y. pestis* коррелировала с напряженностью поствакцинального иммунитета к чуме, индуцированного иммунизацией F1 или смесью F1 и V антигенов.

*Ключевые слова:* чума, поствакцинальный иммунитет, маркер CD69.

Используемая в странах СНГ живая чумная вакцина на основе штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ обеспечивает напряженный иммунитет от бубонной и легочной чумы за счет стимуляции как гуморального, так и клеточного звеньев иммунитета [2, 5], но обладает рядом существенных недостатков. Ревакцинация живой вакциной с интервалом менее 6 месяцев индуцирует иммунный ответ, достаточный для быстрой элиминации бактерий вакцинного штамма из организма. Это препятствует развитию полноценного процесса ревакцинации и не обеспечивает поддержания напряженного иммунитета на уровне, достаточном для защиты от последующего заражения вирулентными штаммами. Кроме того, живая вакцина может вызывать у части иммунизированных сторонние реакции различной степени тяжести, а также генерализованный инфекционный процесс у лиц с нарушениями иммунного статуса [1, 2, 5, 10]. В последнее время многие исследователи работают над конструированием «химических» (субъединичных) чумных вакцин. Эти вакцины позволяют за счет введения в их состав только индивидуальных иммунодоминантных антигенов *Y. pestis* значительно снизить реактогенность препарата в целом; эффективны для ревакцинации; могут быть использованы на фоне экстренной профилактики антибиотиками и исключают возможность возникновения инфекционного процесса у лиц с нарушениями иммунного статуса. Основным их недостатком является то, что большинство индивидуальных антигенов, в отличие от бактериальных клеток, индуцируют преимущественно гуморальный иммунитет [3, 7, 8, 10].

Решающим критерием профилактической ценности вакцин у людей является их эпидемиологическая эффективность, которую проводят на основе анализа снижения уровня заболеваемости среди вакцинированного населения. Оценка эффективности вакцинации против чумы затруднена в связи с тем, что в последние годы отмечаются лишь спорадические вспышки этой инфекции. До последнего вре-

мени косвенную оценку эффективности вакцинации проводили путем определения поствакцинальных титров антител к использованным для иммунизации антигенам (F1 и V) [10, 11]. Однако в целом ряде случаев серонегативные животные обладали напряженным иммунитетом к чуме [8].

Вышеизложенные факты указывают на необходимость разработки эффективных и воспроизводимых косвенных методов оценки напряженности клеточного звена поствакцинального иммунитета к чуме.

Одним из методов оценки активации лимфоцитов является скрининг экспрессии поверхностных маркеров клеток. CD69 рецептор – маркер ранней активации появляется на поверхности антиген- или аллерген-специфически активированных *in vitro* лимфоцитов [4, 9]. Экспрессируясь на поверхности клетки рецептор CD69 действует как костимулирующая молекула Т-клеточной активации и пролиферации [4, 12].

*Цель исследования* – оценить способность антигенов чумного микроба F1 и V специфически активировать в системе *in vitro* субпопуляции Т-лимфоцитов мышей линии BALB/c, иммунизированных против чумы.

### **Материалы и методы**

Мышей линии BALB/c (5 групп по 5 животных) иммунизировали подкожно двукратно с интервалом 4 недели 0,9 % раствором натрия хлорида, гидроксидом алюминия – контрольные группы; антигенами *Y. pestis*, сорбированными на гидроокиси алюминия: V, F1, или смесью F1 и V антигенов. На 28-е сутки после второй иммунизации у мышей отбирали сыворотку крови и спленоциты.

*Определение титра антител.* Для определения титра антител использовали твердофазный иммуноферментный анализ. Сыворотки тестировали на планшетах, сенсibilизированных отдельно антигенами V и F1. В качестве контролей использовали сыворотки не иммунизированных мышей и сыворотки животных, которым вводили суспензию гидроокиси

алюминия без антигенов.

F1 и V антигены сорбировали на планшеты в течение 1 ч при 37 °С в 0,1 М карбонатном буфере, рН 9,6. После каждого этапа планшеты промывали 10 мМ трис-буфером, содержащим 0,15 М NaCl и 0,05 % твина-20, рН 7,2. Начиная с разведения 1:1000, антитела разводили с шагом в 2,5 раза. Каждую сы-воротку тестировали на трех различных планшетах. Продолжительность инкубации с рабочими растворами на всех этапах составляла 1 ч при 37 °С. Конъюгаты антимышиных антител с пероксидазой хрена разводили 1:3000. В качестве субстрата использовали ортофенилендиамин, ферментативную реакцию останавливали через 15 мин 1 М раствором серной кислоты и определяли оптическую плотность растворов в лунках при 490 нм. При измерении использовали функцию автоматического вычитания фона.

**Определение поверхностных маркеров лимфоцитов.** Спленоциты ( $5 \cdot 10^5$  кл/мл) каждой группы мышей выделяли и инкубировали в лунках 96-луночного планшета по 200 мкл 24 ч при 37 °С, во влажной атмосфере, 5 % CO<sub>2</sub> в присутствии F1 (1 и 10 мкг/мл) или V антигена (1 и 10 мкг/мл) чумного микроба. В качестве положительного контроля служили лимфоциты иммунных и интактных мышей, активированные ConA (5 мкг/мл), в качестве отрицательного – лимфоциты иммунных и интактных мышей без стимуляции *in vitro*. По окончании инкубирования спленоциты отмывали и окрашивали моноклональными антителами к поверхностным маркерам CD3 PerCP (BD Biosciences Farmigen), CD4 APC, CD8 PE, CD69 FITC (Caltag, Invitrogen).

Анализ проводили на проточном цитофлюориметре FACSCalibur (Becton Dickinson) в объеме, указанном фирмой-производителем, и инкубировали в темноте в течение 15 мин при 20 °С.

Лимфоциты гейтировали – выделяли для анализа клетки с общими физическими параметрами светорассеяния и интенсивностью флюоресценции. Анализировали 10 тысяч событий каждого образца. После этого клетки отмывали и фиксировали. Готовые пробы хранили при 4 °С до проведения цитометрического исследования.

Процент клеток, несущих маркер CD69, определяли с помощью трехцветного цитометрического анализа в программе «Cell Quest».

**Определение напряженности иммунитета.** Оценку вирулентности проводили на мышах в условиях лаборатории уровня биологической безопасности BSL3. Мышей заражали подкожно 10-кратно возрастающими дозами суспензии 28-градусных культур *Y. pestis* 231 в 0,9 % растворе натрия хлорида в объеме 0,2 мл на животное (заражающая доза составляла от  $2 \cdot 10^0$  до  $2 \cdot 10^5$  КОЕ). Каждой заражающей дозой иммунизировали группу, состоящую из 5 животных. Наблюдение за зараженными животными проводили в течение 21 сут, погибших животных вскрывали и подвергали бактериологическому исследованию. Вычисление величин LD<sub>50</sub> проводили по

методу Кэрбера в модификации [6]. Напряженность иммунитета (индекс иммунитета (ИИ)), т.е. способность вакцинного препарата предохранять животное от заражения массивными дозами вирулентной культуры, определяли по величине заражающей дозы, выраженной в LD<sub>50</sub> вирулентного штамма для интактных животных, при заражении которой на 21-е сутки выживает не менее 50 % животных, определяли по формуле:

$$\text{ИИ} = \frac{LD50_{\text{имм}}}{LD50_{\text{инт}}}$$

где ИИ – индекс иммунитета; LD50<sub>имм</sub> – LD<sub>50</sub> для животных, иммунизированных исследуемым препаратом; LD50<sub>инт</sub> – LD<sub>50</sub> для интактных животных, КОЕ.

Все эксперименты с животными, описанные в данной работе, одобрены комитетом по биоэтике Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии.

## Результаты и обсуждение

На рис. 1 отображен порядок гейтирования лимфоцитов (логическое ограничение клеток по заданным параметрам), который позволяет выявить функционально-активированные субпопуляции Т-хелперов и цитотоксических лимфоцитов, несущих на поверхности CD69 рецептор.

В отрицательных контролях (клетки иммунных и интактных мышей, инкубированные 24 ч в полной среде RPMI) количество CD69-позитивных Т-хелперов и Т-супрессоров составляло 3–8 %. В положительных контролях (клетки иммунных и интактных мышей, инкубированные 24 ч в полной среде RPMI с ConA) появлялось до 90 % активированных CD69-клеток у интактных животных и 40–60 % CD69-позитивных лимфоцитов у животных, иммунизированных гидроксидом алюминия или антигенами чумного микроба, сорбированными на гидроокиси алюминия. Снижение способности лимфоцитов иммунных мышей экспрессировать ранний маркер активации CD69 в ответ на митогенный стимулятор ConA обусловлено развитием неспецифической иммунодепрессивной реакции за счет формирования иммунного ответа на антигены чумного микроба.

Стимуляция лимфоцитов интактных животных *in vitro* антигенами чумного микроба F1 или V в дозах 1 или 10 мкг/мл не приводила к усилению экспрессии на поверхности клеток CD69 рецептора (рис. 2).

Выраженное увеличение активированных Т-хелперов (60,69 %) и цитотоксических лимфоцитов (58,95 %) в ответ на стимуляцию спленоцитов *in vitro* F1 чумного микроба обнаружено в группе мышей, иммунизированных смесью антигенов чумного микроба F1 и V. Сыворотки крови этой группы мышей характеризуются высокими титрами антител к F1 и V антигенам чумного микроба (таблица). По сравне-

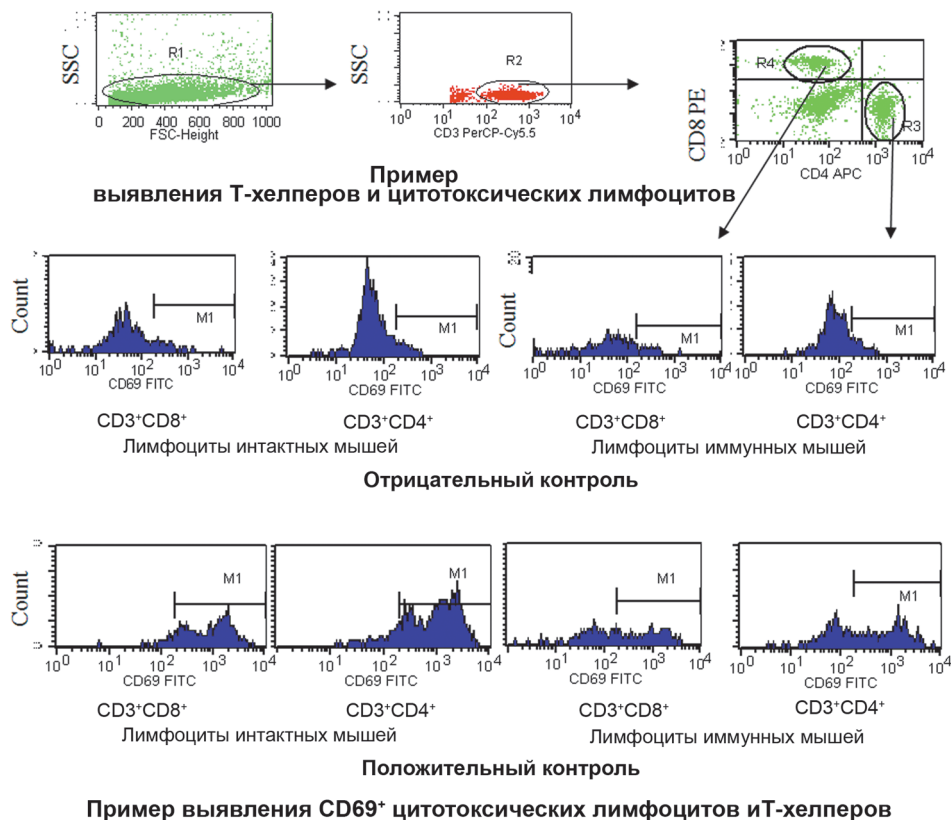


Рис. 1. Экспрессия раннего маркера активации CD69 на Т-хелперах (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) и цитотоксических лимфоцитах (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) intactных и иммунных мышей

На рисунках показана последовательность выявления активированных популяций Т-лимфоцитов.

По боковому SSC и прямому FSC светорассеиванию гейтируют клетки различного размера без гранул – гейт (область) R1. Из гейта R1 выбирают позитивные по CD3<sup>+</sup> рецептору лимфоциты R2. Внутри популяции CD3<sup>+</sup> лимфоцитов (правая верхняя цитограмма) выделяют Т-хелперы CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (R3) и цитотоксические лимфоциты CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (R4). В каждой субпопуляции CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> клеток определяют процент CD69<sup>+</sup> лимфоцитов. На линейных графиках (второй и третий ряд цитограмм) CD69-позитивные лимфоциты расположены под отрезком M1.

Положительный контроль – клетки intactных и иммунных мышей, стимулированные ConA; отрицательный – лимфоциты без стимуляции.

нию с фоном, средние значения которого составляли 0,02 оптических единицы против фосфатно-солевого буфера с Твином 20, достоверное повышение величины оптических плотностей для группы животных, иммунизированных смесью антигенов чумного микроба F1 и V, отмечалось при разведении сывороток  $5 \cdot 10^{-6}$ . У мышей, иммунизированных смесью анти-

генов чумного микроба F1 и V, формировался выраженный противочумный иммунитет (ИИ = 22241).

Достоверно-значимое увеличение CD69-позитивных лимфоцитов (18,61 % Т-хелперов и 23,25 % – цитотоксических лимфоцитов) в ответ на стимуляцию *in vitro* F1 чумного микроба отмечено также в группе мышей, иммунизированных F1 антигеном

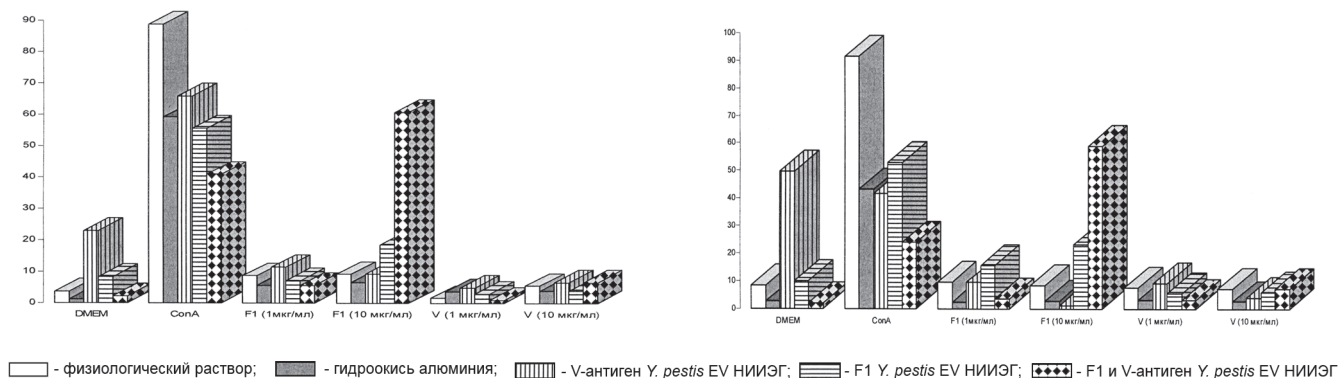


Рис. 2. Процент Т-хелперов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) и цитотоксических лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) intactных и иммунных мышей, экспрессирующих ранний маркер активации CD69, после стимуляции их *in vitro* антигенами чумного микроба

Левая диаграмма отображает процентное содержание CD69<sup>+</sup> Т-хелперов, правая – CD69<sup>+</sup> цитотоксических лимфоцитов. По оси абсцисс указано наличие стимуляторов в среде. Высота столбца отображает процент CD69-позитивных клеток в субпопуляции Т-лимфоцитов. Узор столбца идентифицирует группы мышей, иммунизированных одним и тем же препаратом



Оценка протективности поствакцинального противочумного иммунитета в экспериментальных группах мышей

Группа мышей	LD <sub>50</sub> , КОЕ	ИИ	CD69 <sup>+</sup> , %*		Разведение сывороток <sup>1</sup>	
			CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	F1	V
Интактные	1 (0,1–1,4)**	1	9,19	8,32	0	0
Иммунизированные Al(OH) <sub>3</sub>	1 (0,1–2)**	1	6,66	2,7	0	0
Иммунизированные V	222 (56–885)**	222	9,29	1,34	-	5·10 <sup>-6</sup>
Иммунизированные F1	2224 (558–88544)**	2224	18,61	23,45	10 <sup>-4</sup>	-
Иммунизированные F1 + V	22241 (7033–88543)**	22241	60,69	58,95	2·10 <sup>-5</sup>	5·10 <sup>-6</sup>

Примечания: <sup>1</sup> – максимальное разведение сывороток, при котором выявляются антитела к антигенам чумного микроба; ИИ – индекс иммунитета; \* n = 5 (спленоциты пулированы от 5 мышей); \*\* пределы колебаний LD<sub>50</sub>.

чумного микроба. Максимальное разведение сывороток, при котором выявляли антитела к F1 антигену чумного микроба, составило 10<sup>-4</sup>. Индекс иммунитета составил 2224.

V антиген чумного микроба в дозах 1 или 10 мкг/мл не обладал способностью индуцировать *in vitro* усиление экспрессии CD69 рецептора на поверхности лимфоцитов мышей. Максимальное разведение сывороток, при котором выявляли антитела к V антигену чумного микроба, составило 5·10<sup>-6</sup>, индекс иммунитета – 2224.

Титры сывороток против антигена F1 у мышей, иммунизированных смесью антигенов, заметно превышали те же параметры у животных, которым вводили только F1, то есть при введении двух белков, антиген V усиливал гуморальный иммунный ответ на антиген F1. Титры антител против V антигена у мышей, иммунизированных только одним белком V и смесью белков, практически совпадали.

Увеличение невосприимчивости к заражению чумной инфекцией у мышей, иммунизированных смесью антигенов чумного микроба (F1 и V), коррелировало с появлением значительного количества CD69-позитивных Т-хелперов и цитотоксических лимфоцитов в ответ на стимуляцию их *in vitro* F1 антигеном чумного микроба.

Таким образом, экспрессия раннего маркера активации CD69 в субпопуляциях Т-хелперов и цитотоксических лимфоцитов в ответ на стимуляцию *in vitro* F1 *Y. pestis* коррелировала с напряженностью поствакцинального иммунитета к чуме, индуцированной иммунизацией F1 или смесью F1 и V антигенов.

Работа выполнена по проекту РФФИ 08-04-00405-а и Государственному контракту № 119-Д от 11.06.2009 г. в рамках Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белов Л.Г., Дальвадяню С.М. В кн.: Микробиологическая лабораторная диагностика и специфическая профилактика карантинных инфекций. Саратов; 1987. С. 84–90.  
2. Дальвадяню С.М., Дробышева Т.М. Сравнительное изуче-

ние напряженности противочумного иммунитета у белых мышей, привитых «химической», убитой и живыми чумными вакцинами. Пробл. особо опасных инф. 1977; 6(58):31–3.

3. Коробкова Е.И. Живая противочумная вакцина. М.: Медгиз, 1956. 208 с.

4. Мейл Д. Иммунология. М.: Логосфера; 2007. 568 с.

5. Наумов А.В., Ледванов М.Ю., Дроздов И.Г. Иммунология чумы. Саратов; 1992. 172 с.

6. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Государственное издательство медицинской литературы, 1962. С. 85–104.

7. Anisimov A.P., Lindler L.E., Pier G.B. Intraspecific diversity of *Yersinia pestis*. Clin. Microbiol. Rev. 2004; 17(2):434–64.

8. Smiley S.T. Cell-mediated defense against *Yersinia pestis* infection. Adv. Exp. Med. Biol. 2007; 603:376–86.

9. Testi R., D'Ambrosio D., De Maria R., Santoni A. The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. Immunol. Today. 1994; 15(10):479–83.

10. Tibball R.W., Williamson E.D. *Yersinia pestis* (plague) vaccines. Expert. Opin. Biol. Ther. 2004; 4(6):965–73.

11. Williamson ED, Flick-Smith HC, Lebutt C, Rowland CA, et al. Human immune response to a plague vaccine comprising recombinant F1 and V antigens. Infect. Immun. 2005; 73(6):3598–608.

12. Ziegler S.F., Ramsdell F., Alderson M.R. The activation antigen CD69. Stem Cells. 1994; 12(5):456–65.

V.V.Firstova, I.V.Bakhteeva, G.M.Titareva, E.V.Zyrina, S.A.Ivanov, N.V.Kisseleva, P.Kh.Kopylov, A.P.Anisimov, I.A.Dyatlov

**Determination of the Expression of CD69 Marker of Early Activation in the Immune Mice Lymphocytes after their Stimulation with Plague Agent Antigens**

*SSC of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk*

Evaluated was the ability of plague microbe antigens F1 and V to activate specifically in the *in vitro* system subpopulations of T-lymphocytes of BALB/c mice immunized against plague. The level of CD69 expression at the lymphocytes surface was proposed to be evaluated as the marker of lymphocytes activation. Expression of CD69 early marker of activation in subpopulations of T-helpers and cytotoxic lymphocytes, reciprocated by the *in vitro* stimulation with *Y. pestis* F1, correlated with the intensity of the anti-plague postvaccinal immunity induced by immunization with F1 or F1 and V antigens mixtures.

Key words: plague, postvaccinal immunity, CD69 marker.

**Об авторах:**

Фирстова В.В., Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Зырина Е.В., Иванов С.А., Киселева Н.В., Копылов П.Х., Анисимов А.П., Дятлов И.А. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Оболensk. E-mail: firstova@obolensk.org

**Authors:**

Firstova V.V., Bakhteeva I.V., Titareva G.M., Zyrina E.V., Ivanov S.A., Kisseleva N.V., Kopylov P.Kh., Anisimov A.P., Dyatlov I.A. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk. E-mail: firstova@obolensk.org

Поступила 21.10.09.