

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-28>

## Влияние иммуномодуляции на внутриклеточную экспрессию цитокинов Т-хелперами селезёнки мышей, иммунизированных *Yersinia pestis* EV НИИЭГ

Клюева С.Н.<sup>✉</sup>, Гончарова А.Ю., Кравцов А.Л., Бугоркова С.А.

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Россия

### Аннотация

**Цель** работы — охарактеризовать внутриклеточную экспрессию цитокинов Т-хелперами селезенки и спонтанную продукцию цитокинов в крови мышей линии BALB/c, иммунизированных *Yersinia pestis* EV НИИЭГ на фоне иммуномодуляции.

**Материалы и методы.** Внутриклеточную экспрессию CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> определяли в суспензии клеток селезенки мышей методом проточной цитометрии, а IFN- $\gamma$  и IL-10 — в супернатантах крови методом иммуноферментного анализа на 3-и и 21-е сутки после иммунизации *Y. pestis* EV НИИЭГ на фоне иммуномодуляции. Заражение животных *Y. pestis* 231 в дозе 400 LD<sub>50</sub> проводили на 21-е сутки после иммунизации.

**Результаты.** Выявлены различия в цитокиновом ответе при введении исследуемых препаратов, коррелирующие с уровнем CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> у животных. Так, на 3-и сутки установлено достоверное снижение CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> при введении *Y. pestis* EV НИИЭГ и препарата рекомбинантного  $\gamma$ -интерферона (ингарон). В ответ на применение вакцинного штамма с азоксимером бромидом (полиоксидоний) регистрировали значимое повышение CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>. На 21-е сутки внутриклеточная экспрессия всех исследуемых цитокинов IFN- $\gamma$ , IL-4 и IL-17 увеличивалась в среднем в 2,3 раза при использовании иммуномодуляторов в схеме иммунизации. Кроме того, на 21-е сутки регистрировали достоверное ( $p < 0,05$ ) увеличение доли Т-хелперов, экспрессирующих IFN- $\gamma$ , а также уровня спонтанной продукции IFN- $\gamma$  в супернатантах крови только у животных, иммунизированных с применением схем, включающих иммуномодуляторы. При заражении *Y. pestis* 231 животных, предварительно иммунизированных в сочетании с полиоксидонием, методом корреляционного анализа подтверждена связь ( $r = 0,94$ ;  $p = 0,0004$ ) выживаемости мышей с интенсивностью экспрессии CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>.

**Заключение.** Полученные данные подтверждают эффективность применения полиоксидония в схемах иммунизации экспериментальных животных *Y. pestis* EV НИИЭГ и информативность оценки степени протекции, создаваемой иммунизацией, по результатам внутриклеточной экспрессии цитокинов.

**Ключевые слова:** *Yersinia pestis*, азоксимера бромид, рекомбинантный интерферон-гамма, Т-хелперы, цитокины, проточная цитометрия

**Этическое утверждение.** Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом РосНИПЧИ «Микроб».

**Источник финансирования.** Исследование выполнено при поддержке бюджетного финансирования в рамках темы НИР № АААА-А16-118011590103-А.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Для цитирования:** Клюева С.Н., Гончарова А.Ю., Кравцов А.Л., Бугоркова С.А. Влияние иммуномодуляции на внутриклеточную экспрессию цитокинов Т-хелперами селезёнки мышей, иммунизированных *Yersinia pestis* EV НИИЭГ. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021; 98(2): 156–162. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-28>

# Influence of immunomodulation on intracellular cytokine expression by spleen T-helpers of mice immunized by *Yersinia pestis* EV NIEG

Svetlana N. Klyueva<sup>✉</sup>, Anastasiya Yu. Goncharova, Aleksandr L. Kravtsov, Svetlana A. Bugorkova

Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia

## Abstract

**Aim.** To characterize the intracellular expression of cytokines by spleen T-helpers and the spontaneous production of cytokines in the blood of BALB/c mice immunized with *Yersinia pestis* EV NIEG against the background of immunomodulation.

**Materials and methods.** Intracellular expression of CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> was determined in mice spleen cell suspensions by flow cytometry, IFN- $\gamma$  and IL-10 were measured in ELISA in blood supernatants on day 3 and day 21 after the immunization with *Y. pestis* EV against the background of immunomodulation. On day 21 after the immunization animals were infected by *Y. pestis* 231 at a dose of 400 LD<sub>50</sub>.

**Results.** Differences in cytokine response to studied drugs, correlated with CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> levels in animals, were identified. On day 3, a significant decrease in CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> was observed in response to *Y. pestis* EV and to recombinant gamma interferon (Ingaron). A significant increase in CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> was detected in response to vaccine strain administered with azoximer bromide (Polyoxidonium). Intracellular expression of IFN- $\gamma$ , IL-4 and IL-17 increased on day 21 by an average of 2,3 times when immunomodulators were used in the immunization schedule. In addition, on day 21 a significant ( $p < 0.05$ ) increase in the proportion of T-helpers expressing IFN- $\gamma$ , as well as in level of spontaneous IFN- $\gamma$  production in blood supernatants was observed only in animals immunized by schedules that included immunomodulators. After the challenge with *Y. pestis* 231 of animals previously immunized by schedules that included Polyoxidonium, the correlation analysis confirmed the association ( $r = 0,94$ ;  $p = 0,0004$ ) of mice survival with intensity of CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> expression.

**Conclusion.** The data obtained confirm the effectiveness of Polyoxidonium application in experimental animal *Y. pestis* EV immunization schedule and the usefulness of intracellular cytokine expression measurement for assessment of the level of protection following the immunization.

**Keywords:** *Yersinia pestis*, azoximer bromide, recombinant gamma interferon, T-helper cells, cytokines, flow cytometry

**Ethics approval.** Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe».

**Funding source.** The study was supported by budget funding within the framework of the research topic No AAA-A-16-118011590103-A.

**Conflict of interest.** The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**For citation:** Klyueva S.N., Goncharova A.Yu., Kravtsov A.L., Bugorkova S.A. Influence of immunomodulation on intracellular cytokine expression by spleen T-helpers of mice immunized by *Yersinia pestis* EV NIEG. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(2): 156–162. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-49>

## Введение

Применение иммуномодуляторов — это один из способов воздействия на реактивность клеток иммунной системы для повышения эффективности вакцинации, в том числе против чумы [1]. В России зарегистрирован ряд веществ, обладающих иммуномодулирующими и адьювантными свойствами, охарактеризован их иммуномодулирующий потенциал. Так, адьювантные свойства азоксимера бромид (полиоксидоний, ПО) и рекомбинантного интерферона-гамма (IFN- $\gamma$ , ингарон) используют в составе различных вакцин [2]. Экспериментально доказан модулирующий эффект

ПО при сочетанном применении с *Yersinia pestis* EV НИИЭГ, выражающийся в стимуляции процесса антителообразования, повышении эффективности протективных характеристик вакцинного штамма и в снижении его цитотоксического воздействия на иммунную систему биомоделей [3–6].

В зависимости от набора секретируемых цитокинов, факторов транскрипции и путей передачи сигналов эффекторные CD4<sup>+</sup>-Т-хелперные лимфоциты подразделяются на Th1-, Th2-, Th9-, Th17-, Th22- и Tfh-субпопуляции [7]. В защите организма от инфекции важную роль играют продуцируемые Т-клетками цитокины, которые, например, в виде

рекомбинантных препаратов широко используют в качестве адьювантов и для повышения эффективности специфической профилактики против ряда инфекционных заболеваний, включая чуму [2].

Определение содержания цитокинов в активированных Т-клетках и биологических жидкостях проводят для оценки эффективности защиты в модельных экспериментах при разработке вакцин против чумы и для оценки выраженности противочумного иммунитета [8, 9]. Если концентрация цитокинов в сыворотке или других биологических жидкостях показывает текущее состояние иммунной системы, определение уровня продукции цитокинов мононуклеарами крови отражает функциональное состояние клеток (спонтанная продукция) или их потенциальную способность отвечать на антигенный стимул (индуцированная продукция), то метод внутриклеточного окрашивания цитокинов дает возможность, применяя проточную цитофлюориметрию, определять популяционную принадлежность клеток, продуцирующих тот или иной цитокин [10].

Определение экспрессии цитокинов в стимулированных *in vitro* специфическим антигеном Т-лимфоцитах-хелперах применяли при клинических испытаниях вакцин против туберкулеза, менингита и малярии [10, 11], для оценки клеточного ответа у мышей, иммунизированных антигенами чумного микроба [12].

**Цель работы** — охарактеризовать внутриклеточную экспрессию цитокинов (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17) Т-хелперами селезенки и спонтанную продукцию цитокинов (IFN- $\gamma$ , IL-10) в супернатантах крови мышей линии BALB/c, иммунизированных *Yersinia pestis* EV НИИЭГ на фоне иммуномодуляции.

## Материалы и методы

В работе использовали вакцинный (*Y. pestis* EV НИИЭГ) и вирулентный (*Y. pestis* 231) штам-

мы чумного микроба, полученные из «Государственной коллекции патогенных бактерий» (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»). Культуру *Y. pestis* выращивали на агаре Хоттингера (pH 7,2) в течение 48 ч при  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ . Взвесь *Y. pestis* с концентрацией  $10^9$  КОЕ готовили в 0,9% растворе NaCl pH 7,2 по стандартному образцу мутности ОСО 42-28-59-85П. Методом последовательных разведений доводили концентрацию клеток до  $1 \times 10^2$  КОЕ. Фактическое содержание микробных клеток в 0,1 мл взвеси контролировали путем высева на 3 чашки Петри с агаром Хоттингера.

Экспериментальной моделью служили 270 мышей линии BALB/c массой  $20 \pm 5$  г, полученные из отдела экспериментальных животных с виварием РосНИПЧИ «Микроб». Мыши были разделены на 3 опытных и контрольную группы (табл. 1).

Животных 1-й группы подкожно иммунизировали 2-суточной культурой *Y. pestis* EV НИИЭГ в концентрации  $2,5 \times 10^4$  КОЕ. Мышам 2-й группы за 1 ч до иммунизации вводили ингарон («Фармаклон») в дозе 150 МЕ, а 3-й группы — ПО («ПетроваксФарм») в дозе 4 мкг. Контрольную группу (4-ю) составили интактные мыши.

Работу с животными проводили в соответствии с международными принципами «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей» ETS N 123 (Страсбург, 1986), Приказом Минздрава РФ от 01.04.2016 № 199Н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики», положительным заключением Этического комитета при ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 1 от 15.01.2019).

Мышей выводили из эксперимента на 3-и и 21-е сутки иммуногенеза, выделяли кровь и селезенку. По общепринятому методу готовили взвесь клеток селезенки в концентрации  $10^6$  клеток/мл в сре-

**Таблица 1.** Схема исследования\*

**Table 1.** Study design\*

Группа / Group	Схема иммунизации / Immunization schedule	Заражение / Infection	Количество животных / Number of animals
1	<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ ( $2,5 \times 10^4$ КОЕ)	–	40
	<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ ( $2,5 \times 10^4$ КОЕ) <i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ ( $2,5 \times 10^4$ КОЕ) <i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ ( $2,5 \times 10^4$ КОЕ)	<i>Y. pestis</i> 231 (400 LD <sub>50</sub> )	30
2	<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ ( $2,5 \times 10^4$ КОЕ + Ингарон)	–	40
	<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ ( $2,5 \times 10^4$ КОЕ + Ингарон) <i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ ( $2,5 \times 10^4$ КОЕ + Ингарон)	<i>Y. pestis</i> 231 (400 LD <sub>50</sub> )	30
3	<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ ( $2,5 \times 10^4$ КОЕ + ПО)	–	40
	<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ ( $2,5 \times 10^4$ КОЕ + ПО) <i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ ( $2,5 \times 10^4$ КОЕ + ПО)	<i>Y. pestis</i> 231 (400 LD <sub>50</sub> )	30
4	Контроль / Control	–	30
	Контроль / Control	<i>Y. pestis</i> 231 (400 LD <sub>50</sub> )	30

**Примечание.** \*Все этапы исследования выполнялись в 3 повторях.

**Note.** \*All steps of the study were performed in 3 repetitions.

де RPMI-1640 с гентамицином (100 мкг/мл). Для определения процентного содержания Т-хелперов и доли клеток, положительных по экспрессии IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17, использовали коммерческий набор «Mouse Th1/Th2/Th17 Phenotyping Kit» («BD Biosciences»), который применяли в соответствии с инструкцией производителя. Готовые окрашенные клеточные суспензии анализировали на проточном цитофлюориметре «BD Accuri C6 Plus Flow Cytometer» («Becton Dickinson»). Методом проточной цитометрии во взвесах клеток селезенки по параметрам светорассеяния (размеру и степени гранулярности) дифференцировали лимфоциты и фагоциты, чтобы определить в исследуемых образцах соотношение лимфоцитов и клеток врождённого иммунитета [4].

Гепаринизированную мышиную кровь разводили в соотношении 1 : 4 средой RPMI-1640 с 100 мкг/мл гентамицина. Образцы инкубировали в течение 24 ч при 37°C, затем осаждали центрифугированием при 300g в течение 15 мин, отбирали супернатанты. Спонтанную продукцию цитокинов определяли в супернатантах крови методом иммуоферментного анализа (ИФА) с помощью коммерческих наборов для определения IFN- $\gamma$  и IL-10 («eBioscience»). Исследования выполняли на автоматическом иммуоферментном анализаторе «Lazurit» («Dynex Technologies») при длине волны 450 нм.

На 21-е сутки иммуногенеза часть животных заражали *Y. pestis* 231 в дозе 400 LD<sub>50</sub> (3600 КОЕ). За зараженными животными наблюдали в течение 21 сут. Результат оценивали по количеству выживших животных.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием стандартного пакета программ «Microsoft Office Excel 2016», «Statistica v.10.0» («StatSoft Inc.»). Взаимосвязь между переменными определяли с помощью ран-

гового корреляционного анализа по Спирмену. Достоверность различий сравниваемых величин оценивали с помощью парного *t*-критерия Стьюдента. Данные представляли в виде средней и средней квадратической ошибки средней арифметической.

## Результаты и обсуждение

Основными клетками селезенки мышей были лимфоциты, доля которых изменялась в диапазоне 71–85%. Лишь у мышей 3-й группы на 21-е сутки иммуногенеза отмечали достоверное ( $p < 0,05$ ) снижение общего количества лимфоцитов по отношению к интактным животным, но при этом регистрировали заметное увеличение среди них доли Т-хелперов (табл. 2). В то же время во 2-й группе на 3-и сутки после иммунизации отмечали на фоне 85,8% лимфоцитов снижение доли Т-хелперов до 29,1% (в контроле 34,6%). В целом значимого влияния применённых схем иммунизации на субпопуляционный состав лимфоцитов крови не выявлено.

При оценке внутриклеточной экспрессии IFN- $\gamma$  Т-хелперами селезенки у иммунизированных мышей установлено, что уже на 3-и сутки отмечается статистически значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение доли CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>-клеток (табл. 2), исключением была реакция животных во 2-й группе, где этот показатель был в 1,5 раза ниже ( $p < 0,05$ ), чем в контрольной группе. Возможно, такая реакция Т-хелперов у мышей, иммунизированных *Y. pestis* в сочетании с ингаляцией, обусловлена повышением секреции цитокина во внеклеточное пространство. В пользу этого положения свидетельствуют данные по значительному увеличению спонтанной продукции IFN- $\gamma$  мононуклеарами крови (до 78,8 пг/мл), выявленному методом ИФА.

К 21-м суткам наблюдения регистрировали достоверное ( $p < 0,05$ ) увеличение доли Т-хелперов, экспрессирующих IFN- $\gamma$ , а также уровня спонтанной продукции IFN- $\gamma$  в супернатантах крови толь-

**Таблица 2.** Влияние иммуномодуляторов на показатели клеточного иммунитета мышей линии BALB/c, иммунизированных *Y. pestis* EV НИИЭГ ( $M \pm m$ )

**Table 2.** The effect of immunomodulators on the cellular immunity of BALB/c mice immunized with *Y. pestis* EV NIEG ( $M \pm m$ )

Группа Group	Сутки Day	Общее количество лимфоцитов, % Total amount of lymphocytes, %	Доля Т-хелперов CD4 <sup>+</sup> , % The proportion of T-helpers CD4 <sup>+</sup> , %	IFN- $\gamma$ в супернатантах крови, пг/мл IFN- $\gamma$ in blood supernatants, pg/ml	CD4 <sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> , %	CD4 <sup>+</sup> IL-4 <sup>+</sup> , %	CD4 <sup>+</sup> IL-17 <sup>+</sup> , %
1	3	78,8 ± 1,4	32,0 ± 0,4	58,3 ± 3,06*	20,8 ± 2,9*	4,3 ± 0,3*	12,2 ± 1,1
	21	82,0 ± 1,9	31,8 ± 1,9	54,1 ± 3,4*	18,4 ± 2,5	2,3 ± 0,2	13,3 ± 2,0*
2	3	85,8 ± 1,7	29,1 ± 1,2	78,8 ± 4,6*	10,4 ± 0,7*	1,3 ± 0,2*	5,7 ± 1,1
	21	71,8 ± 4,6	37,9 ± 1,9	58,9 ± 5,35*	20,9 ± 2,4*	4,4 ± 0,7*	21,0 ± 2,3*
3	3	79,1 ± 4,3	30,6 ± 1,4	57,2 ± 2,2*	26,1 ± 2,5*	2,2 ± 0,2	9,9 ± 1,0
	21	60,2 ± 2,7*	47,4 ± 1,1*	47,9 ± 1,05*	44,4 ± 2,6*	6,1 ± 0,5*	31,2 ± 3,7*
4	–	81,2 ± 4,8	34,6 ± 1,3	28,2 ± 3,23	16,3 ± 1,6	2,6 ± 0,4	8,3 ± 2,1

**Примечание.** \* $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

**Note.** \* $p < 0,05$  compared to control.

ко у животных, иммунизированных с применением схем, включающих иммуномодуляторы.

На 3-и сутки иммуногенеза применённые схемы иммунизации отличались и по реакции  $CD4^+IL-4^+$ . Так, если у мышей в 1-й группе экспрессия  $IL-4^+$  была выше в 1,7 раза, чем у интактных животных, а во 2-й группе — в 2 раза ниже, то в 3-й группе регистрировали реакцию на уровне контроля. К 21-м суткам после иммунизации только в группах мышей, иммунизированных в сочетании с иммуномодуляторами, отмечали достоверное увеличение доли  $CD4^+IL-4^+$ -клеток.

На 3-и сутки после иммунизации аналогичная тенденция была прослежена и относительно  $CD4^+IL-17^+$ -клеток. Доля Т-хелперов, синтезирующих  $IL-17$ , достоверно ( $p < 0,05$ ) повышалась во всех трёх опытных группах только на 21-е сутки иммуногенеза. В этот период у мышей, привитых живой чумной вакциной, формируется, как известно, наиболее напряжённый противочумный иммунитет [4].

Из полученных данных следует, что применённые схемы иммунизации мышей отличались по своей реакции со стороны  $CD4^+IFN-\gamma^+$ ,  $CD4^+IL-4^+$ ,  $CD4^+IL-17^+$ -клеток преимущественно в нестерильной фазе формирования противочумного иммунитета.

Отсутствие ингибирующего эффекта на внутриклеточное накопление  $IFN-\gamma$  в Т-хелперах на ранней стадии иммуногенеза при включении в схемы иммунизации ПО укладывается в ранее выявленную способность этого иммуномодулятора стимулировать как раннюю фазу антигенспецифического противочумного иммунного ответа, ускоряя появление и исчезновение лимфоцитов с рецепторами к капсульному антигену (F1) *Y. pestis*, так и его эффекторную фазу, способствуя более раннему развитию антительного ответа [5].

Максимальное увеличение показателей  $CD4^+IFN-\gamma^+$ ,  $CD4^+IL-4^+$ ,  $CD4^+IL-17^+$ , зарегистрированное в 3-й группе на 21-е сутки ( $p < 0,05$ ), возможно, объясняется комплементарным действием  $IL-17$  и  $IFN-\gamma$ , что согласуется с данными зарубежных исследователей, продемонстрировавших синергическое участие этих цитокинов в коорди-

нации антимикробного потенциала нейтрофилов и макрофагов в защите от острой легочной чумы [13]. Кроме того, способность ПО повышать уровень экспрессии  $IFN-\gamma$  в Т-хелперах свидетельствует о формировании в организме приобретённого поствакцинального иммунитета, оцениваемого по изменению продукции именно этого цитокина [14].

При анализе взаимосвязи относительных количеств  $CD4^+$ -Т-хелперов, синтезирующих цитокины, с общим содержанием  $CD3^+CD4^+$ -клеток в процессе иммуногенеза выявлен ряд корреляционных связей: в 1-й группе — для  $CD4^+IFN-\gamma^+$  и  $CD4^+IL-17^+$  ( $r = 0,83-0,88$ ;  $p = 0,04$ ), а во 2-й группе — для  $CD4^+IFN-\gamma^+$ ,  $CD4^+IL-4^+$ ,  $CD4^+IL-17^+$  ( $r = 0,83-0,94$ ;  $p = 0,02$ ).

Нормальное функционирование иммунной системы строится на балансе Th1- и Th2-клеток, обусловленном продукцией этими клетками определенных регуляторных цитокинов. Для характеристики направленности сдвига функционального баланса в системе Th1/Th2-клеток сравнили изменение соотношения в культуре спленоцитов —  $CD4^+IFN-\gamma^+/CD4^+IL-4^+$  и в супернатантах крови — Th1- и Th2-ассоциированных цитокинов ( $IFN-\gamma/IL-10$ ). Из данных, приведенных в табл. 3, следует, что во всех опытных группах соотношение  $CD4^+IFN-\gamma^+/CD4^+IL-4^+$  было значимо больше 1,0 и превышало аналогичный показатель у интактных мышей, что подтверждало популяционное превалирование активированных Th1-клеток у животных, иммунизированных против чумы. В то же время, ориентируясь только на оценку функционального состояния мононуклеаров по спонтанной продукции Th1- и Th2-ассоциированных цитокинов в супернатантах крови, можно не вполне адекватно оценить факт снижения соотношения  $IFN-\gamma/IL-10$ , трактуя его как смещение в сторону Th2-ответа. В комплексе характеристика как популяционной принадлежности активированных клеток, так и их функционального состояния позволяет более точно определять направленность иммунологических реакций у иммунизированных животных.

На 21-е сутки после иммунизации *Y. pestis* EV НИИЭГ в концентрации  $2,5 \times 10^4$  КОЕ, а также в

**Таблица 3.** Коэффициенты соотношений Th1- и Th2-клеток и ассоциированных с ними цитокинов ( $M \pm m$ )

**Table 3.** Ratios of Th1 cells to Th2 cells and their associated cytokines ( $M \pm m$ )

Группа Group	$CD4^+IFN-\gamma^+/CD4^+IL-4^+$		$IFN-\gamma/IL-10$	
	3-и сутки / day 3	21-е сутки / day 21	3-и сутки / day 3	21-е сутки / day 21
1	6,02 ± 0,37	7,87 ± 0,35	1,94 ± 0,19*	3,59 ± 0,67
2	7,05 ± 0,15	6,7 ± 1,19	2,39 ± 0,22	1,38 ± 0,2*
3	11,78 ± 0,48*	7,27 ± 0,34	0,89 ± 0,07*	0,96 ± 0,02*
4	5,82 ± 0,47		2,73 ± 0,18	

**Примечание.** \* $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

**Note.** \* $p < 0,05$  compared to control.

сочетании с иммуномодуляторами по 10 животных из каждой группы заражали подкожно 400 LD<sub>50</sub> вирулентного штамма *Y. pestis* 231. Наблюдение за мышами проводили в течение 21 сут, учитывая количество выживших животных в группах. Установлено, что в 1-й группе выжили 9 животных при средней продолжительности жизни  $5,1 \pm 0,4$  дня, во 2-й — 3 животных при средней продолжительности жизни  $5,5 \pm 0,4$  дня, а в 3-й группе все животные оставались живы в течение всего срока наблюдения.

Затем был проведен корреляционный анализ между показателями выживаемости животных в группах и уровнем внутриклеточной экспрессии изучаемых цитокинов. Выявлена высокая степень прямой связи ( $r = 0,94$ ;  $p = 0,0004$ ) между количеством выживших животных и повышением доли Т-лимфоцитов, экспрессирующих IFN- $\gamma$  у мышей из 3-й группы, что подтверждает имеющиеся сведения об определяющей роли IFN- $\gamma$  в эффективности клеточного иммунного ответа [15].

В то же время меньшая эффективность сочетанного применения *Y. pestis* с ингароном, сопровождающаяся снижением доли CD4<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> в нестерильной фазе формирования иммунного ответа, по-видимому, можно объяснить возможностью использования рекомбинантного человеческого IFN- $\gamma$  бактериальными клетками вакцинного штамма для индукции апоптоза Т-клеток у мышей как одного из механизмов уклонения патогена от реакции иммунной системы [15].

Установленный факт увеличения доли CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>-лимфоцитов в 2,7 раза по сравнению с интактными животными и корреляции эффективности экспрессии IFN- $\gamma$  Т-клетками иммунной системы мышей с их выживаемостью при заражении вирулентной культурой чумного микроба позволяет сделать вывод о перспективности применения ПО в схемах вакцинации против чумы. Это согласуется с ранее полученными нами данными о стимулирующем фагоцитарную и цитокин-продуцирующую активность лейкоцитов крови по отношению к чумному микробу потенциале ПО [8]. Иммуномодулирующий эффект ингарона оказался не достаточным для формирования напряжённого иммунитета у экспериментальных животных.

Таким образом, современные представления о механизмах действия иммуномодуляторов в сочетании с новыми экспериментальными данными, полученными при выполнении настоящей работы, позволили подтвердить эффективность применения именно ПО в схемах иммунизации экспериментальных животных вакцинным штаммом *Y. pestis* EV НИИЭГ и информативность оценки степени протекции, создаваемой иммунизацией, по результатам внутриклеточной экспрессии цитокинов Т-хелперами селезенки.

#### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Verma S.K., Tuteja U. Plague vaccine development: current research and future trends. *Front. Immunol.* 2016; 7: 602. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00602>
2. Омельченко Н.Д., Иванова И.А., Беспалова И.А., Филиппенко А.В. Иммуномодуляторы и специфическая профилактика инфекционных болезней. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2017; (3): 21–6. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2017-3-21-2>
3. Бугоркова С.А., Курылина А.Ф., Щуковская Т.Н. Морфофункциональная характеристика иммунокомпетентных органов мышей линии Balb/c при иммунизации вакцинным штаммом *Yersinia pestis* EV НИИЭГ на фоне иммуномодуляции. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2017; (2): 58–62. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2017-2-58-62>
4. Кравцов А.Л., Курылина А.Ф., Ключева С.Н., Щуковская Т.Н. Модулирующий эффект полиоксидония на реактивность клеток иммунной системы при формировании противочумного иммунитета. *Иммунология.* 2016; 37(6): 320–5. <https://doi.org/10.18821/0206-4952-2016-37-6-320-325>
5. Пономарева Т.С., Дерябин П.Н., Каральник Б.В., Тугамбаев Т.И., Атшабар Б.Б., Денисова Т.Г. и др. Влияние полиоксидония на иммуногенную и протективную активность живой чумной вакцины. *Иммунология.* 2014; 35(5): 286–90.
6. Щуковская Т.Н., Курылина А.Ф., Шавина Н.Ю., Бугоркова С.А. Влияние полиоксидония, Poly(I:C), даларгина на защитное действие вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ при экспериментальной чуме. *Российский иммунологический журнал.* 2020; 23(1): 41–50. <https://doi.org/10.15789/1028-7221-005-IOP>
7. Костарева О.С., Габдулхаков А.Г., Коляденко И.А., Гарбер М.Б., Тищенко С.В. Интерлейкин-17: функциональные и структурные особенности; использование в качестве терапевтической мишени. *Успехи биологической химии.* 2019; 59: 393–418.
8. Ключева С.Н., Кравцов А.Л., Бугоркова С.А., Щуковская Т.Н., Кожевников В.А., Гончарова А.Ю. Фагоцитарная и цитокин-продуцирующая активность лейкоцитов крови мышей линии Balb/c, привитых против чумы на фоне иммуномодуляции полиоксидонием. *Российский иммунологический журнал.* 2019; 13(4): 1412–20. <https://doi.org/10.31857/S102872210007044-3>
9. Parent M.A., Wilhelm L.B., Kummer L.W., Szaba F.M., Mullarky I.K., Smiley S.T. Gamma interferon, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide synthase 2, key elements of cellular immunity, perform critical protective functions during humoral defense against lethal pulmonary *Yersinia pestis* infection. *Infect. Immun.* 2006; 74(6): 3381–6. <https://doi.org/10.1128/iai.00185-06>
10. Smith S.G., Smits K., Joosten S.A., Meijgaarden K.E., Satti I., Fletcher H.A., et al. Intracellular cytokine staining and flow cytometry: Considerations for application in clinical trials of novel tuberculosis vaccines. *PLoS One.* 2015; 10(9): e0138042. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138042>
11. Flaxman A., Ewer K.J. Methods for measuring T-cell memory to vaccination: from mouse to man. *Vaccines (Basel).* 2018; 6(3): 43. <https://doi.org/10.3390/vaccines6030043>
12. Leal E.A., Moreira J.D., Nunes F.F., Souza L.R., Martins J.M., Toledo V.P.C., et al. Humoral and cellular immune response of mice challenged with *Yersinia pestis* antigenic preparations. *Braz. J. Infect. Dis.* 2017; 21(6): 620–6. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2017.09.001>
13. Bi Y., Zhou J., Yang H., Wang X., Zhang X., Wang Q., et al. IL-17A produced by neutrophils protects against pneumonic plague through orchestrating IFN- $\gamma$ -activated macrophage programming. *J. Immunol.* 2014; 192(2): 704–13. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301687>
14. Бугоркова С.А., Щуковская Т.Н., Микшиш Н.И., Ключева С.Н., Кудрявцева О.М., Кравцов А.Л. и др. Комплексное

иммунологическое исследование вакцинированных живой чумной вакциной лиц, проживающих на территории Прикаспийского песчаного очага чумы в Республике Калмыкия. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2018; 17(3): 38–49. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-3-38-50>

15. Луцкий А.А., Жирков А.А., Лобзин Д.Ю., Рао М., Алексеева Л.А., Мейерер М. и др. Интерферон- $\gamma$ : биологическая функция и значение для диагностики клеточного иммунного ответа. *Журнал инфектологии*. 2015; 7(4): 10–22. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2015-7-4-10-22>

#### REFERENCES

- Verma S.K., Tuteja U. Plague vaccine development: current research and future trends. *Front. Immunol.* 2016; 7: 602. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00602>
- Omel'chenko N.D., Ivanova I.A., Bepalova I.A., Filippenko A.V. Immunomodulators and specific prophylaxis of infectious diseases. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2017; (3): 21–6. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2017-3-21-2> (in Russian)
- Bugorkova S.A., Kurylina A.F., Shchukovskaya T.N. Morphological-functional characteristics of immune competent organs of balb/c mice in case of vaccination with *Yersinia pestis* NIEG strain against the background of immune modulation. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2017; (2): 58–62. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2017-2-58-62> (in Russian)
- Kravtsov A.L., Kurylina A.F., Klyueva S.N., Shchukovskaya T.N. The modulating effect of polyoxidonium on the reactivity of immune cells in the formation of anti-plague immunity. *Immunologiya*. 2016; 37(6): 320–5. <https://doi.org/10.18821/0206-4952-2016-37-6-320-325> (in Russian)
- Ponomareva T.S., Deryabin P.N., Karal'nik B.V., Tugambaev T.I., Atshabar B.B., Denisova T.G., et al. The impact of polyoxidonium on immunogenic and protective activity alive plague vaccine. *Immunologiya*. 2014; 35(5): 286–90. (in Russian)
- Shchukovskaya T.N., Kurylina A.F., Shavina N.Yu., Bugorkova S.A. Influence of polyoxidonium, poly(I:C), dalargin on the protective efficacy of *Yersinia pestis* vaccine strain EV line NIEG in experimental plague. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal*. 2020; 23(1): 41–50. <https://doi.org/10.15789/1028-7221-005-IOP> (in Russian)
- Kostareva O.S., Gabdulkhakov A.G., Kolyadenko I.A., Garber M.B., Tishchenko S.V. Interleukin-17: functional and structural features; use as a therapeutic target. *Uspekhi biologicheskoy khimii*. 2019; 59: 393–418. (in Russian)
- Klyueva S.N., Kravtsov A.L., Bugorkova S.A., Shchukovskaya T.N., Kozhevnikov V.A., Goncharova A.Yu. Blood leukocyte phagocytic and cytokine-producing activity of anti-plague vaccinated Balb/c line mice against the background of immunomodulation by polyoxidonium. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal*. 2019; 13(4): 1412–20. <https://doi.org/10.31857/S102872210007044-3> (in Russian)
- Parent M.A., Wilhelm L.B., Kummer L.W., Szaba F.M., Mullarky I.K., Smiley S.T. Gamma interferon, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide synthase 2, key elements of cellular immunity, perform critical protective functions during humoral defense against lethal pulmonary *Yersinia pestis* infection. *Infect. Immun.* 2006; 74(6): 3381–6. <https://doi.org/10.1128/iai.00185-06>
- Smith S.G., Smits K., Joosten S.A., Meijgaarden K.E., Satti I., Fletcher H.A., et al. Intracellular cytokine staining and flow cytometry: considerations for application in clinical trials of novel tuberculosis vaccines. *PLoS One*. 2015; 10(9): e0138042. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138042>
- Flaxman A., Ewer K.J. Methods for measuring T-cell memory to vaccination: from mouse to man. *Vaccines (Basel)*. 2018; 6(3): 43. <https://doi.org/10.3390/vaccines6030043>
- Leal E.A., Moreira J.D., Nunes F.F., Souza L.R., Martins J.M., Toledo V.P.C., et al. Humoral and cellular immune response of mice challenged with *Yersinia pestis* antigenic preparations. *Braz. J. Infect. Dis.* 2017; 21(6): 620–6. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2017.09.001>
- Bi Y., Zhou J., Yang H., Wang X., Zhang X., Wang Q., et al. IL-17A produced by neutrophils protects against pneumonic plague through orchestrating IFN- $\gamma$ -activated macrophage programming. *J. Immunol.* 2014; 192(2): 704–13. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301687>
- Bugorkova S.A., Shchukovskaya T.N., Mikshis N.I., Klyueva S.N., Kudryavtseva O.M., Kravtsov A.L., et al. Comprehensive immunological study of persons vaccinated with live plague vaccine living on the territory of the pre-Caspian sand foci of the plague in the Republic of Kalmykia. *Epidemiologiya i vaksinosprofilaktika*. 2018; 17(3): 38–49. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-3-38-50> (in Russian)
- Lutskiy A.A., Zhirkov A.A., Lobzin D.Yu., Rao M., Alekseeva L.A., Meyrer M., et al. Interferon- $\gamma$ : biological function and application for study of cellular immune response. *Zhurnal infekologii*. 2015; 7(4): 10–22. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2015-7-4-10-22> (in Russian)

#### Информация об авторах

Клюева Светлана Николаевна<sup>✉</sup> — к.б.н., н.с. отд. иммунологии, РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, Россия, [klyueva.cvetlana@mail.ru](mailto:klyueva.cvetlana@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0002-5550-6063>

Гончарова Анастасия Юрьевна — к.м.н., н.с. отд. иммунологии РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9994-7936>

Кравцов Александр Леонидович — д.б.н., в.н.с. отд. иммунологии, РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9016-6578>

Бугоркова Светлана Александровна — д.м.н., и.о. зав. отд. иммунологии РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7548-4845>

**Участие авторов.** Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 23.04.2020;  
принята к публикации 15.12.2021;  
опубликована 10.03.2021

#### Information about the authors

Svetlana N. Klyueva<sup>✉</sup> — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Department of immunology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia, [klyueva.cvetlana@mail.ru](mailto:klyueva.cvetlana@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0002-5550-6063>

Anastasiya Yu. Goncharova — Cand. Sci. (Med.), researcher, Department of immunology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9994-7936>

Aleksandr L. Kravtsov — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Department of immunology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9016-6578>

Svetlana A. Bugorkova — D. Sci. (Med.), deputy head, Department of immunology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7548-4845>

**Author contribution.** All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 23.04.2020;  
accepted for publication 15.12.2021;  
published 10.03.2021