

## **ОЦЕНКА УРОВНЯ ГУМОРАЛЬНОГО И КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ПОСЛЕ РЕВАКЦИНАЦИИ ПРОТИВ ЧУМЫ ЛИЦ, ПРОЖИВАЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ ПРИКАСПИЙСКОГО ПЕСЧАНОГО ПРИРОДНОГО ОЧАГА**

**Клюева С.Н.<sup>1</sup>, Бугоркова С.А.<sup>1</sup>, Щуковская Т.Н.<sup>1</sup>, Санджиев Д.Н.<sup>2</sup>,  
Конушева С.В.<sup>2</sup>, Савченко С.П.<sup>2</sup>, Хасыкова Б.А.<sup>2</sup>, Щербакова С.А.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт „Микроб“», г. Саратов, Россия

<sup>2</sup> Управление Роспотребнадзора по Республике Калмыкия, г. Элиста, Россия

**Резюме.** На фоне возрастания потенциальной эпидемической опасности территорий ряда природных очагов чумы и проведения мероприятий по обеспечению специфической профилактики этой инфекции возникает необходимость тщательного мониторинга состояния иммунитета у вакцинированных (ревакцинированных) лиц. Цель исследования – оценить уровень гуморального и клеточного иммунитета после неоднократной противочумной ревакцинации. Оценку показателей иммунного ответа на ревакцинацию против чумы проводили по результатам клинического исследования образцов крови от 20 человек в возрасте от 24 до 53 лет, проживающих на территории Прикаспийского песчаного природного очага чумы. Определяли титры специфических антител к F1 чумного микроба (тест-система «ИФА-АТ-Ф1 YERSINIA PESTIS», ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Россия), а также спонтанную и индуцированную конканавалином А продукцию цитокинов IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-4, IL-10 (ЗАО «Вектор-Бест», Россия), IL-17A (Bender Medsystems, Австрия). Исследования проводили до ревакцинации и через 1, 6, 12 месяцев после ее проведения.

Полученные результаты указывают на то, что после ревакцинации живой чумной вакциной в большинстве случаев иммунологическая перестройка происходила по смешанному Th1/Th2-типу. Обнаружение антител к F1 чумного микроба до и через 1 месяц после ревакцинации (65 и 85% соответственно) свидетельствовало о формировании гуморального иммунного ответа. Выявлены наиболее информативные цитокины-маркеры (IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$ ) для оценки противочумного клеточного иммунитета. Установленное до ревакцинации трехкратное повышение индуцированной продукции IFN $\gamma$  свидетельствовало об исходной иммунологической компетентности всех обследованных лиц. Определена высокая степень корреляционных связей TNF $\alpha$  с остальными учитываемыми цитокинами. Факт обнаружения высокой силы корреляционной связи для изученных цитокинов (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-10) указывал на синхронность реакции иммунокомпетентных клеток (Т-хелперов). По изменению уровня спонтанной и индуцированной продукции цитокинов можно косвенно судить о степени выраженности противочумного клеточного иммунитета у людей.

**Ключевые слова:** гуморальный иммунитет, клеточный иммунитет, цитокины, антитела, иммуноглобулины, циркулирующие иммунные комплексы

### **Адрес для переписки:**

Клюева Светлана Николаевна  
ФКУЗ «Российский научно-исследовательский  
противочумный институт „Микроб“»  
410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, 46.  
Тел.: 8 (452) 26-21-31.  
Факс: 8 (452) 51-52-12.  
E-mail: klyueva.cvetlana@mail.ru

### **Address for correspondence:**

Klyueva Svetlana N.  
Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”  
410005, Russian Federation, Saratov, Universitetskaya str., 46.  
Phone: 7 (452) 26-21-31.  
Fax: 7 (452) 51-52-12.  
E-mail: klyueva.cvetlana@mail.ru

### **Образец цитирования:**

С.Н. Клюева, С.А. Бугоркова, Т.Н. Щуковская,  
Д.Н. Санджиев, С.В. Конушева, С.П. Савченко,  
Б.А. Хасыкова, С.А. Щербакова «Оценка уровня  
гуморального и клеточного иммунитета после  
ревакцинации против чумы лиц, проживающих  
на территории Прикаспийского песчаного природного  
очага» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 2.  
С. 241-250. doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-241-250  
© Клюева С.Н. и соавт., 2018

### **For citation:**

S.N. Klyueva, S.A. Bugorkova, T.N. Shchukovskaya,  
D.N. Sandzhiev, S.V. Konusheva, S.P. Savchenko,  
B.A. Khasykova, S.A. Shcherbakova “Evaluation of humoral  
and cellular immunity level among persons living in the Caspian  
natural sandy focus territory after anti-plague revaccination”,  
*Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*,  
2018, Vol. 20, no. 2, pp. 241-250.  
doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-241-250  
DOI: 10.15789/1563-0625-2018-2-241-250

## EVALUATION OF HUMORAL AND CELLULAR IMMUNITY LEVEL AMONG PERSONS LIVING IN THE CASPIAN NATURAL SANDY FOCUS TERRITORY AFTER ANTI-PLAGUE REVACCINATION

Klyueva S.N.<sup>a</sup>, Bugorkova S.A.<sup>a</sup>, Shchukovskaya T.N.<sup>a</sup>, Sandzhiev D.N.<sup>b</sup>, Konusheva S.V.<sup>b</sup>, Savchenko S.P.<sup>b</sup>, Khasykova B.A.<sup>b</sup>, Shcherbakova S.A.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

<sup>b</sup> Rospotrebnadzor Administration for the Republic of Kalmykia, Elista, Russian Federation

**Abstract.** In view of increasing epidemic danger potential of some natural plague foci and performing measures to provide specific prevention of this infection, it becomes necessary to carefully monitor the state of immunity in vaccinated (revaccinated) individuals. The aim of the study was to assess humoral and cellular immunity levels in the persons after repeated anti-plague revaccination performed for appropriate epidemiological indications. Evaluation of immune responses to anti-plague revaccination was carried out according to studies of blood samples from 20 people aged 24 to 53 years living in the Caspian sandy natural plague focus located at the territory in Kalmykia Republic. Specific antibody titers to the F1 antigen of plague microbe were assessed in blood serum by immunoassay testing using an "ELISA-AT-F1 YERSINIA PESTIS" test system (Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Russia), along with spontaneous and concanavalin A-induced production of different cytokines, i.e., IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-4, IL-10 (Vector-Best, Russia), IL-17A (Bender Medsystems, Austria). The studies were performed before vaccination, and 1, 6, 12 month after the booster vaccination.

The results of the study indicate that immunological reconstitution after revaccination with live plague vaccine occurs mostly according to mixed Th1/Th2 type. Detection of antibodies to the F1 specific plague microbe antigen before and 1 month after revaccination (65 and 85%, respectively) was indicative of development of humoral response. The most informative cytokine markers (IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$ ) for evaluation of an anti-plague cellular immune response have been identified. The threefold increase in IFN $\gamma$  induced production before revaccination indicates to initial immunological competence of all the examined individuals. A high correlation between TNF $\alpha$  and other cytokine levels was determined. The fact of high correlation for the studied cytokines (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-10) indicated to a synchronism in the immunocompetent T helper cell reaction. By measuring the levels of spontaneous and induced cytokine production levels, one may indirectly judge on degree of anti-plague cell immunity in humans.

*Keywords: humoral immunity, cellular immunity, cytokines, antibodies, immunoglobulins, circulating immune complexes*

### Введение

Центральная приморская часть Прикаспийского песчаного очага чумы на протяжении длительного периода времени остается одним из наиболее устойчивых участков чумной энзоотии. Активизация эпизоотий чумы произошла в 2013-2015 гг. на территории Астраханской области, Республики Дагестан, Лаганского и Черноземельского районов Республики Калмыкия. На эпизоотической территории очага проживает около 20 тыс. человек, что свидетельствует о высоком уровне риска заболевания людей чумой. На фоне возрастания потенциальной эпидемиче-

ской опасности территорий ряда природных очагов чумы [1] и проведения мероприятий по обеспечению специфической профилактики этой инфекции возникает необходимость тщательного мониторинга состояния иммунитета у вакцинированных (ревакцинированных) лиц. Ежегодная ревакцинация по эпидемическим показаниям обуславливает высокий уровень антигенной нагрузки на организм, что может приводить к различным осложнениям.

Формирование иммунологической перестройки после вакцинации против чумы у людей протекает с образованием антител, специфичных к капсульному антигену F1 чумного

микроба [11], но учитывая, что в формировании противочумного иммунитета ведущая роль принадлежит клеточным факторам защиты [5, 9], оценка эффективности вакцинации на основании характеристики только уровня специфических антител к F1 чумного микроба носит косвенный характер [2, 15].

Эффективность иммунного ответа на антигены вакцин и способность иммунной системы формировать длительную иммунную память, находятся в зависимости от обмена сигналами между клетками иммунной системы, осуществляемого с помощью низкомолекулярных белков — цитокинов. Поэтому не менее важным показателем формирования протективного иммунитета является оценка Т-клеточного звена по спонтанной и индуцированной продукции иммунорегуляторных цитокинов [13]. Ключевыми цитокинами-маркерами, определяющими тип Т-хелперов, участвующих в формировании противочумного клеточного иммунитета, являются Th1-цитокينات ( $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ ), Th2 (IL-4), IL-17, продуцируемый Т-хелперами 17 типа (Th17) [3, 12].

**Цель исследования** — оценить уровень гуморального и клеточного иммунитета после неоднократной ревакцинации против чумы по эпидемическим показаниям лиц, проживающих на энзоотичной по чуме территории.

## Материалы и методы

В период с марта 2016 г. по март 2017 г. на территории Лаганского и Черноземельского районов Республики Калмыкия было проведено клиническое исследование 20 человек в возрасте от 24 до 53 лет по оценке ряда показателей иммунного ответа на ревакцинацию против чумы. Право на проведение обследования юридически закреплялось информированным письменным согласием каждого обследуемого.

Ревакцинацию проводили отечественной коммерческой живой чумной вакциной (ЖЧВ) производства ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора в соответствии с Календарем профилактических прививок по эпидемическим показаниям (Приказ от 21 марта 2014 г. № 125н «Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям»).

Кровь для исследования забирали из локтевой вены в объеме 9 мл до ревакцинации и через 1, 6,

12 месяцев после ее проведения. В работе были использованы пробирки, содержащие  $K_3EDTA$  и активатор свертывания.

Сыворотку получали из венозной крови, инкубированной в пробирках с Clot Activator “VACUTEST” при 37 °С в течение 1 ч. После центрифугирования при 400 g сыворотку крови отбирали в отдельные микропробирки, замораживали и хранили до использования при -20 °С.

Антитела к F1 *Yersinia pestis* определяли в сыворотках крови непрямой вариант ИФА с помощью иммуноферментной тест-системы «ИФА-АТ-Ф1 YERSINIA PESTIS» (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Россия) в соответствии с инструкцией по применению.

Для определения продукции цитокинов венозную кровь с  $K_3EDTA$  разводили в соотношении 1:4 средой RPMI 1640, содержащей 100 мкг/мл гентамицина. В качестве индуктора продукции цитокинов использовали стандартный Т-клеточный митоген конканавалин А (ПанЭко, Россия) в концентрации 15 мкг/мл. Контролем служили клетки крови, культивируемые только в среде RPMI-1640. Опытные и контрольные образцы инкубировали в течение 24 часов при температуре 37 °С. Затем клеточную суспензию осаждали центрифугированием при 400 g в течение 15 мин, полученные образцы замораживали и хранили до использования при -20 °С.

Спонтанную и индуцированную конканавалином А продукцию цитокинов определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ТИФА) с помощью коммерческих наборов для определения  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ , IL-4, IL-10 (ЗАО «Вектор-Бест», Россия), IL-17A (Bender Medsystems, Австрия). Учет результатов выполняли с использованием программы расчета концентраций по многоточечной калибровке на микропланшетном фотометре Stat Fax-3200 (Awareness Technology, США) при длине волны 450 нм.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием стандартного пакета программ Microsoft Office Excel 2010. Взаимосвязь между переменными определяли с помощью рангового корреляционного анализа по Спирмену. Корреляционные связи считали сильными (тесными) при коэффициенте корреляции  $r = 0,7-1,0$ , умеренной (средней) силы — при  $r = 0,3-0,7$ , слабыми — при  $r = 0-0,3$ ,  $r$  с положительным знаком — прямая связь,  $r$  с отрицательным — обратная. Достоверность уровня различия сравниваемых величин оценивали с помощью U-критерия Манна-Уитни. Полученные

данные представляли в виде  $M \pm m$ , где  $M$  – среднее значение анализируемого показателя,  $m$  – средняя квадратическая ошибка средней арифметической. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## Результаты

Иммуноферментный анализ сывороток обследованных лиц показал, что средние значения обратных титров антител к F1 чумного микроба после ревакцинации достоверно не отличались от данного показателя до ревакцинации (табл. 1). Во все сроки исследования были выявлены серопозитивные лица, у которых зарегистрированы титры специфических антител выше диагностического титра (1:80). Количество серопозитивных лиц среди обследованных составило 65% до ревакцинации и 85% через 1 месяц после ревакцинации. Доля лиц, у которых было зарегистрировано 4-кратное по сравнению с исходным уровнем повышение титра специфических антител к F1 (сероконверсия) после ревакцинации, составила 20%. В этом случае титры антител после ревакцинации соответствовали 1:320-1:1280 против 1:40 до ревакцинации.

Оценку клеточного звена иммунитета проводили по изменению показателей иммунорегуляторных цитокинов. Если результаты исследования спонтанной продукции цитокинов *ex vivo* позволяют оценить активацию клеток крови в организме обследуемого пациента, то индуцированная неспецифическим Т-клеточным митогеном конканавалином А продукция отражает их потенциальную способность к секреции цитоки-

нов и характеризует иммунологическую реактивность организма.

Установлена неравнозначная интенсивность продукции Th1-, Th2-, Th17-цитокинов (табл. 2). Стандартный митоген конканавалин А активно стимулировал выработку цитокинов клетками периферической крови до и в различные сроки после ревакцинации, что свидетельствует о высоких резервных возможностях клеток.

Митогенная стимуляция вызывала статистически достоверное повышение индуцированной продукции  $IFN\gamma$  до ревакцинации и через 1 год после ревакцинации,  $IL-17$  – до ревакцинации, через 1 месяц и 1 год после ревакцинации,  $IL-10$  – через 6 месяцев и 1 год после ревакцинации,  $TNF\alpha$  – через 1 год после ревакцинации относительно аналогичных показателей при спонтанной продукции (табл. 2).

Анализ спонтанной продукции цитокинов показал, что через 1 и 6 месяцев статистически достоверно увеличивается уровень  $IL-4$  относительно аналогичного показателя до ревакцинации. Через 6 месяцев снижаются концентрации  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ ,  $IL-10$  относительно аналогичных показателей до ревакцинации. Через год уровни спонтанной продукции данных цитокинов у всех обследованных соответствовали норме.

Анализ индуцированной продукции цитокинов показал, что через 1 месяц снижается уровень  $IL-17$ , через 6 месяцев – снижаются концентрации  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ ,  $IL-10$ ,  $IL-17$  и повышается концентрация  $IL-4$  относительно аналогичных показателей до ревакцинации. Через 1 год уровни индуцированной продукции данных цитокинов, оставаясь на высоком уровне, в основном не пре-

**ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ТИТРОВ АНТИТЕЛ К КАПСУЛЬНОМУ АНТИГЕНУ ЧУМНОГО МИКРОБА (F1) У РЕВАКЦИНИРОВАННЫХ ЛИЦ**

TABLE 1. ANTIBODY TITERS TO THE CAPSULAR ANTIGEN *YERSINIA PESTIS* (F1) IN REVACCINATED PERSONS

Срок проведения анализа Time of analysis	Обратные титры антител к F1 антигену Reverse antibody titers to F1 antigen $M \pm m$
До ревакцинации Before revaccination	1198±228,0
Через 1 месяц после ревакцинации 1 month after the revaccination	1398±255,93
Через 6 месяцев после ревакцинации 6 months after revaccination	737±109,62
Через 12 месяцев после ревакцинации 12 months after revaccination	1282±285,68
Норма (согласно инструкции к тест-набору) Normal titers (according to the instructions for the test kit)	≤ 1/80 (у не вакцинированных) ≥ 1/80 (у вакцинированных) ≤ 1/80 (in non-vaccinated) ≥ 1/80 (in vaccinated)

ТАБЛИЦА 2. ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ EX VIVO КЛЕТКАМИ КРОВИ РЕВАКЦИНИРОВАННЫХ ЛИЦ  
TABLE 2. PRODUCTION OF CYTOKINES BY EX VIVO TAKEN BLOOD CELLS FROM REVACCINATED PERSONS

Цитокин Cytokine	Спонтанная продукция (M±m), пг/мл Spontaneous production (M±m), pg/ml				Митоген-индуцированная продукция (M±m), пг/мл Mitogen-induced production (M±m), pg/ml			
	1	2	3	4	1	2	3	4
IFN $\gamma$	189,48±23,52	265,41±48,53	5,83±0,96*	2,75±0,89*	645,39±63,27**	339,22±43,82	6,33±1,09*	299,13±60,93***
TNF $\alpha$	176,76±17,76	177,13±22,65	5,55±1,36*	40,42±11,34*	294,31±11,55	187,78±26,57	6,08±0,74*	153,2±23,53***
IL-17A	6,65±2,56	4,29±2,77	3,34±0,89	4,92±0,84	230,02±39,88**	27,8 ±4,56***	3,85±1,55*	189,6±26,13*
IL-4	2,77±0,51	8,35±1,68*	90,83±13,41*	1,79±0,49	4,79±0,89	9,28±1,69	89,9±9,96*	2,81±0,45
IL-10	108,93±11,04	199,08±36,8	3,84±1,33*	12,56±1,92*	252,99±26,95	216,81±39,86	11,95±4,6***	33,45±3,55***
IFN $\gamma$ /IL-4	103,57±20,09	67,1±15,3	0,06±0,004*	3,36±1,34	236,0±51,8	108,25±42,07	0,07±0,005*	131,23±29,08
TNF $\alpha$ /IL-10	1,72±0,16	1,14±0,09*	4,94±0,9*	3,1±0,48	2,33±0,08	1,01±0,06*	4,92±0,88*	4,73±0,66
IFN $\gamma$ + TNF $\alpha$ / IL-4 + IL-10	3,61±0,31	3,29±0,48	0,1±0,006*	2,94±0,44	7,43±1,68	3,31±0,51	0,13±0,012*	12,57±2,14

Примечание. \* – достоверность по сравнению с аналогичным показателем до ревакцинации; \*\* – достоверность по сравнению с аналогичным показателем при спонтанной продукции; 1 – до ревакцинации; 2 – через 1 месяц после ревакцинации; 3 – через 6 месяцев после ревакцинации; 4 – через 1 год после ревакцинации.

Note. \*, reliability in comparison with the same index before revaccination; \*\* – reliability in comparison with the same indicator for spontaneous production; 1, before revaccination; 2, 1 month after the revaccination; 3, 6 months after the revaccination; 4, 1 year after revaccination.

ТАБЛИЦА 3. КОРРЕЛЯЦИОННАЯ МАТРИЦА, ОТРАЖАЮЩАЯ СИЛУ СВЯЗЕЙ МЕЖДУ ПРОЦЕССАМИ ИЗМЕНЕНИЯ СПОНТАННОЙ И ИНДУЦИРОВАННОЙ ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ ДО И ЧЕРЕЗ 1 МЕСЯЦ ПОСЛЕ РЕВАКЦИНАЦИИ

TABLE 3. CORRELATION MATRIX, REFLECTING THE BETWEEN THE PROCESSES OF CHANGING SPONTANEOUS AND INDUCED PRODUCTS OF CYTOKINES BEFORE AND FIX THROUGH 1 MONTH AFTER REVACCINATION

Цитокин Cytokine	IFN $\gamma$ (до) (before)	IFN $\gamma$ (1 месяц) (1 month)	TNF $\alpha$ (до) (before)	TNF $\alpha$ (1 месяц) (1 month)	IL-4 (до) (before)	IL-4 (1 месяц) (1 month)	IL-10 (до) (before)	IL-10 (1 месяц) (1 month)	IL-17 (до) (before)	IL-17 (1 месяц) (1 month)
IFN $\gamma$ (до) / IFN $\gamma$ (before)	1,000	–	0,038	–	-0,122	–	0,103	–	0,332	–
IFN $\gamma$ (1 месяц) / IFN $\gamma$ (1 month)	–	1,000	–	-0,452*	–	–	-0,312	–	–	-0,359
TNF $\alpha$ (до) / TNF $\alpha$ (before)	<b>0,597*</b>	–	1,000	–	-0,217	–	0,522*	–	0,025	–
TNF $\alpha$ (1 месяц) / TNF $\alpha$ (1 month)	–	<b>0,334</b>	–	1,000	–	–	0,848*	–	–	0,610*
IL-4 (до) / IL-4 (before)	-0,166	–	<b>0,440</b>	–	1,000	–	0,254	–	0,462*	–
IL-4 (1 месяц) / IL-4 (1 month)	–	-0,083	–	<b>-0,736*</b>	–	–	–	-0,608*	–	-0,433
IL-10 (до) / IL-10 (before)	<b>0,008</b>	–	-0,019	–	<b>0,147</b>	–	1,000	–	0,406	–
IL-10 (1 месяц) / IL-10 (1 month)	–	<b>0,331</b>	–	<b>0,865*</b>	–	–	–	1,000	–	0,523*
IL-17 (до) / IL-17 (before)	<b>0,605*</b>	–	<b>0,749*</b>	–	<b>0,147</b>	–	<b>0,008</b>	–	1,000	–
IL-17 (1 месяц) / IL-17 (1 month)	–	<b>0,162</b>	–	<b>0,810*</b>	–	–	–	<b>0,750*</b>	–	1,000

Примечание. \* – зависимость признаков статистически достоверна (p < 0,05); обычным шрифтом отмечены значения коэффициента корреляции Спирмена (r) при спонтанной продукции цитокинов; жирным шрифтом отмечены значения r при индуцированной продукции цитокинов.

Note. \*, dependence of signs is statistically significant (p < 0.05); in normal type, the values of the Spearman correlation coefficient (r) for spontaneous production of cytokines are noted; the values of r in induced production of cytokines are indicated in bold type.

ТАБЛИЦА 4. КОРРЕЛЯЦИОННАЯ МАТРИЦА, ОТРАЖАЮЩАЯ СИЛУ СВЯЗЕЙ МЕЖДУ ПРОЦЕССАМИ ИЗМЕНЕНИЯ СПОНТАННОЙ И ИНДУЦИРОВАННОЙ ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ ЧЕРЕЗ 6 И 12 МЕСЯЦЕВ ПОСЛЕ РЕВАКЦИНАЦИИ

TABLE 4. CORRELATION MATRIX, REFLECTING CORRELATIONS BETWEEN THE PROCESSES OF CHANGING THE SPONTANEOUS AND INDUCED CYTOKINE PRODUCTION OVER 6 AND 12 MONTHS AFTER REVACCINATION

Цитокин Cytokine	IFN $\gamma$ (до) (before)	IFN $\gamma$ (1 месяц) (1 month)	TNF $\alpha$ (до) (before)	TNF $\alpha$ (1 месяц) (1 month)	IL-4 (до) (before)	IL-4 (1 месяц) (1 month)	IL-10 (до) (before)	IL-10 (1 месяц) (1 month)	IL-17 (до) (before)	IL-17 (1 месяц) (1 month)
IFN $\gamma$ (до) / IFN $\gamma$ (before)	1,000	–	0,506*	–	0,528*	–	0,621*	–	-0,002	–
IFN $\gamma$ (1 месяц) / IFN $\gamma$ (1 month)	–	1,000	–	0,207	–	0,353	–	-0,151	–	0,046
TNF $\alpha$ (до) / TNF $\alpha$ (before)	<b>0,344</b>	–	1,000	–	0,602*	–	0,456*	–	-0,305	–
TNF $\alpha$ (1 месяц) / TNF $\alpha$ (1 month)	–	<b>0,904*</b>	–	1,000	–	0,155	–	0,573	–	-0,046
IL-4 (до) / IL-4 (before)	<b>0,439</b>	–	<b>0,711*</b>	–	1,000	–	0,239	–	-0,123	–
IL-4 (1 месяц) / IL-4 (1 month)	–	0,409	–	0,523*	–	1,000	–	0,203	–	0,221
IL-10 (до) / IL-10 (before)	<b>0,465*</b>	–	<b>0,067</b>	–	<b>0,315</b>	–	1,000	–	0,017	–
IL-10 (1 месяц) / IL-10 (1 month)	–	0,444	–	<b>0,538*</b>	–	<b>0,227</b>	–	1,000	–	0,133
IL-17 (до) / IL-17 (before)	<b>-0,183</b>	–	<b>-0,018</b>	–	<b>0,266</b>	–	<b>0,024</b>	–	1,000	–
IL-17 (1 месяц) / IL-17 (1 month)	–	<b>0,666*</b>	–	<b>0,716*</b>	–	<b>0,228</b>	–	<b>0,668*</b>	–	1,000

Примечание. \* – зависимость признаков статистически достоверна ( $p < 0,05$ ); обычным шрифтом отмечены значения коэффициента корреляции Спирмена ( $r$ ) при спонтанной продукции цитокинов; жирным шрифтом отмечены значения  $r$  при индуцированной продукции цитокинов.

Note. \* dependence of signs is statistically significant ( $p < 0,05$ ); in normal font, we noted the values of Spearman correlation coefficient ( $r$ ) for spontaneous production of cytokines; the  $r$  values for induced production of cytokines are indicated in bold type.

вышали максимальных показателей референсных значений.

По изменению соотношения цитокинов-маркеров можно оценить, в какую сторону идет дифференцировка Т-клеток. Для характеристики сдвигов баланса Th1/Th2 использовали соотношения концентраций IFN $\gamma$ /IL-4, TNF $\alpha$ /IL-10, IFN $\gamma$  + TNF $\alpha$ /IL-4 + IL-10.

Анализ соотношения концентраций IFN $\gamma$  + TNF $\alpha$ /IL-4 + IL-10 показал, что до ревакцинации и через 1 месяц после ревакцинации дифференцировка хелперов происходит в сторону Th1-ответа с преимуществом синтеза IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$ , но через 6 месяцев зарегистрировано его снижение в 36 раз ( $p < 0,05$ ), что свидетельствует о переключении Th1-иммунного ответа на Th2. Через 1 год после ревакцинации происходило обратное смещение дифференцировки Т-хелперов в сторону Th1-ответа.

Далее была проведена оценка взаимосвязей между различными цитокинами. До ревакцинации (табл. 3) выявлена тесная положительная корреляционная связь между индуцированной продукцией TNF $\alpha$  и IL-17 ( $p < 0,05$ ). Спустя 1 месяц после ревакцинации (табл. 3) сильная положительная корреляция обнаружена при спонтанной продукции TNF $\alpha$  и IL-10 ( $p < 0,001$ ). При митогенной стимуляции выявлены тесные положительные корреляционные связи между TNF $\alpha$  и IL-10, TNF $\alpha$  и IL-17, IL-10 и IL-17 ( $p < 0,001$ ), отрицательные сильные корреляционные связи между TNF $\alpha$  и IL-4, IL-4 и IL-10, IL-4 и IL-17 ( $p < 0,001$ ). Через 6 месяцев (табл. 4) после ревакцинации тесная положительная корреляционная связь установлена между индуцированной продукцией TNF $\alpha$  и IL-4 ( $p < 0,001$ ), а через 1 год (табл. 4) – между индуцированной продукцией TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  и IL-17 ( $p < 0,001$ ).

Наиболее высокую степень тесноты связей с остальными цитокинами во все сроки исследования продемонстрировал TNF $\alpha$ .

При сопоставлении показателей клеточного и гуморального иммунитета до ревакцинации наблюдали отрицательную корреляцию умеренной силы между отношением концентраций TNF $\alpha$ /IL-10 при спонтанной продукции и показателями титров специфических антител к F1 антигену чумного микроба ( $r = -0,539$ ,  $p < 0,05$ ). Через 1 месяц после ревакцинации отмечали положительную

корреляцию умеренной силы между отношением концентраций  $IFN\gamma/IL-4$  при спонтанной продукции и показателями титров специфических антител к F1 ( $r = 0,450$ ,  $p < 0,05$ ).

## Обсуждение

Индукция специфических антител считается основным показателем формирования протективного иммунитета для большинства вакцин [10]. Косвенную оценку эффективности вакцинации проводят путем определения поствакцинальных титров специфических антител к антигенам чумного микроба (F1 и V) [14].

Выявление 65% серопозитивных лиц до ревакцинации, вероятно, является следствием предыдущей вакцинации. Последующая ревакцинация привела к усилению образования титров специфических антител в сыворотке крови (85% серопозитивных лиц), что подтверждает данные других исследователей о детекции у вакцинированных против чумы людей антител к F1 в период от 6 до 12 месяцев после вакцинации [2]. Доля ревакцинированных лиц, у которых зарегистрирована сероконверсия, составила 20%, что согласуется с данными, представленными ранее в литературе об отсутствии 100% сероконверсии у вакцинированных ЖЧВ, а процент положительной сероконверсии варьирует в пределах 35-80% [8].

Серологическая оценка иммунологической эффективности не отражает в полной мере истинный уровень иммунобиологической перестройки в организме вакцинированного против чумы, а ее результаты не коррелируют с функциональной активностью клеток врожденного и адаптивного иммунитета. Установленный факт корреляции между уровнем антител к F1 и V антигенам чумного микроба у мышей и протективностью противочумного иммунитета, обусловленный участием специфических антител в активации иммунного ответа по Th1-типу, не имеет подтверждения у людей.

Установлено, что в формировании противочумного иммунитета ведущая роль принадлежит клеточным факторам [5, 9], а наличие специфических антител не всегда коррелирует с защитой организма от чумной инфекции [13]. Важным показателем формирования протективного иммунитета является оценка Т-клеточного звена по продукции иммунорегуляторных цитокинов. Продукентами цитокинов являются лимфоциты, макрофаги, гранулоциты, ретикулярные фибро-

бласты, эндотелиальные клетки и другие типы клеток.

В результате презентации антигенов дендритной клеткой «наивным» Т-лимфоцитам в региональных лимфоузлах образуются различные субпопуляции антиген-специфичных Т-лимфоцитов, такие как Th1, Th2, Th17, Treg (регуляторные Т-клетки) и Tfh (фолликулярные хелперные Т-клетки). Дифференцировка Т-лимфоцитов на клетки Th1- и Th2-типов проявляется, в частности, в виде специализации этих клеток относительно выработки определенного набора цитокинов. Система цитокинов действует по принципу сетей, поэтому необходимо одновременно определять несколько ключевых цитокинов, позволяющих охватить изучаемый процесс с разных сторон [4].

Показана ключевая роль двух провоспалительных медиаторов  $IFN\gamma$  и  $TNF\alpha$  в развитии противочумного иммунного ответа. Активация митоген-индуцированной продукции цитокина  $IFN\gamma$  до ревакцинации доказывает то, что исходно исследуемые лица были иммунологически компетентны. Известно, что  $IFN\gamma$  играет важную роль в осуществлении врожденного и приобретенного иммунитета против вирусных и внутриклеточных бактериальных инфекций, а также обладает иммуностимулирующим и иммуномодулирующим действием.  $IFN\gamma$  регулирует дифференцировку и функции многих типов иммунных клеток и тесно вовлечен в процесс, связанный с формированием Th1-опосредованного иммунного ответа путем регулирования дифференциации, активации и гомеостаза Т-клеток.  $IFN\gamma$  ингибирует развитие Th2-пути, но способствует формированию регуляторных Т-клеток.

По изменению соотношения цитокинов-маркеров, таких как  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$  (Th1-иммунный ответ) и  $IL-4$ ,  $IL-10$  (Th2-иммунный ответ), можно оценить, в какую сторону идет дифференцировка Т-клеток. Проведенный анализ свидетельствует о преобладании Th1-иммунного ответа до ревакцинации, а также через 1 месяц и 1 год после ревакцинации и Th2-иммунного ответа – через 6 месяцев после ревакцинации.

Анализ корреляционных взаимосвязей позволил нам оценить направленность и синхронность изменения уровня цитокинов в ответ на ревакцинацию ЖЧВ. Установлена особая роль  $TNF\alpha$ , выполняющего функцию не только эффекторного медиатора цитотоксичности, но и принимающего участие в регуляции различных физиологических и патологических процессов в организме.

Отрицательная корреляция средней силы, выявленная между отношением концентраций  $TNF\alpha/IL-10$  при спонтанной продукции и показателями титров антител к F1, свидетельствует о разнонаправленных процессах формирования гуморального и клеточного звеньев иммунитета до ревакцинации. Наличие положительной корреляционной связи средней силы между отношением общего количества  $IFN\gamma$  и  $IL-4$  и уровнем АТ к F1 чумного микроба подтверждает развитие Th1-иммунного ответа, обеспечивающего клеточные механизмы защиты.

Выявленная активация Th1-ассоциированных цитокинов через 1 месяц после ревакцинации, вероятно, связана с происходящими со стороны иммунной системы изменениями в ответ на введение ЖЧВ, что проявляется в достоверном повышении на фоне вакцинации уровня содержания в крови Th1-лимфоцитов. А как известно, Т-хелперный 1-го типа иммунный ответ развивается под влиянием патоген-специфических Т-клеток, которые и секретируют  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$  [6]. Кроме того, цитокины  $IFN\gamma$  и  $TNF\alpha$  обеспечивают неспецифическую активацию про-

фессиональных фагоцитов и формирование продуктивных гранул при чуме, возникающих в результате пролиферации и трансформации способных к фагоцитозу клеток.

## Заключение

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что после ревакцинации живой чумной вакциной происходит активация гуморального и клеточного звеньев противочумного иммунитета и отмечается смешанный Th1/Th2-иммунный ответ. Выявлены наиболее информативные цитокины-маркеры ( $IFN\gamma$  и  $TNF\alpha$ ) для оценки уровня противочумного клеточного иммунного ответа. Высокие показатели коэффициентов корреляции, полученные для различных цитокинов, свидетельствуют о синхронности реакции иммунокомпетентных клеток (Т-хелперов), следовательно, по изменению уровня спонтанной и индуцированной продукции цитокинов можно косвенно судить о степени выраженности противочумного клеточного иммунитета у людей.

## Список литературы / References

1. Балахонov С.В., Попова А.Ю., Мищенко А.И., Михайлов Е.П., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Денисов А.В., Рождественский Е.Н., Базарова Г.Х., Щучинов Л.В., Зарубин И.В., Семенова Ж.Е., Маденова Н.М., Дюсенбаев Д.К., Ярыгина М.Б., Чипанин Е.В., Косилко С.А., Носков А.К., Корзун В.М. Случай заболевания человека чумой в Кош-Агачском районе республики Алтай в 2015 г. Сообщение 1. Клинико-эпидемиологические и эпизоотологические аспекты // Проблемы особо опасных инфекций, 2016. № 1. С. 55-60. [Balakhonov S.V., Popova A.Yu., Mishchenko A.I., Mikhaylov E.P., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Denisov A.V., Rozhdestvenskiy E.N., Bazarova G.Kh., Shchuchinov L.V., Zarubin I.V., Semenova Zh.E., Madenova N.M., Dyusenbaev D.K., Yarygina M.B., Chipanin E.V., Kosilko S.A., Noskov A.K., Korzun V.M. A Case of human infection with plague in the Kosh-Agach region of the republic of Altai in 2015. Communication 1. Clinical-Epidemiological and Epizootiological Aspects. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2016, no. 1, pp. 55-60. (In Russ.)]
2. Фирстова В.В., Калмантаева О.В., Горбатов А.А., Кравченко Т.Б., Тюрин Е.А., Бондаренко Н.Л., Дятлов И.А., Караулов А.В. Оценка специфического гуморального и клеточного иммунитета у людей, периодически вакцинирующихся против чумы // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2015. №3. С. 62-68. [Firstova V.V., Kalmantaeva O.V., Gorbатов A.A., Kravchenko T.B., Tyurin E.A., Bondarenko N.L., Dyatlov I.A., Karaulov A.V. Specific humoral and cellular immunity in humans periodically vaccinated against plague. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = International Journal of Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2015, no. 3, pp. 62-68. (In Russ.)]
3. Bi Y., Zhou J., Yang H., Wang X., Zhang X., Wang Q., Wu X., Han Y., Song Y., Tan Y., Du Z., Yang H., Zhou D., Cui Y., Zhou L., Yan Y., Zhang P., Guo Z., Wang X., Liu G., Yang R. IL-17A produced by neutrophils protects against pneumonic plague through orchestrating  $IFN\gamma$ -activated macrophage programming. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 192, pp. 704-713.
4. Eriksson M., Sartono E., Martins C.L., Balé C., Garly M.L., Whittle H., Aaby P., Pedersen B.K., Yazdanbakhsh M., Erikstrup C., Benn C.S. A comparison of *ex vivo* cytokine production in venous and capillary blood. *Clin. Exp. Immunol.*, 2007, Vol. 150, no. 3, pp. 469-476.

5. Levy Y., Flashner Y., Tidhar A., Zauberman A., Aftalion M., Lazar S., Gur D., Shafferman A., Mamroud E. T cells play an essential role in anti-F1 mediated rapid protection against bubonic plague. *Vaccine*, 2011, Vol. 29, no. 40, pp. 6866-6873.
6. Li B., Yang R. Interaction between *Yersinia pestis* and the host immune system. *Infect. Immun.*, 2008, Vol. 76, no. 5, pp. 1804-1811.
7. Li B., Zhou L., Guo J., Wang X., Ni B., Ke Y., Zhu Z., Guo Z., Yang R. High-throughput identification of new protective antigens from a *Yersinia pestis* live vaccine by enzyme-linked immunospot assay. *Infect. Immun.*, 2009, Vol. 77, no. 10, pp. 4356-4361.
8. Li B., Du C., Zhou Lei, Bi Y., Wang X., Wen L., Guo Z., Song Z., Yang R. Humoral and cellular immune responses to *Yersinia pestis* infection in long-term recovered plague patients. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2012, Vol. 19, no. 2, pp. 228-234.
9. Philipovskiy A.V., Smiley S.T. Vaccination with live *Yersinia pestis* primes CD4 and CD8 T Cells that synergistically protect against lethal pulmonary *Y. pestis* infection. *Infection and Immunity*, 2007, Vol. 75, no. 2, pp. 878-885.
10. Plotkin S.A. Correlates of Protection Induced by Vaccination. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2010, Vol. 17, no. 7, pp. 1055-1065.
11. Rajerison M., Darteville S., Ralafiarisoa L.A., Bitam I., Tuyet Dinh Thi Ngoc, Andrianaivoarimanana V., Nato F., Rahalison L. Development and evaluation of two simple, rapid immunochromatographic tests for the detection of *Yersinia pestis* antibodies in humans and reservoirs. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2009, Vol. 3, no. 4, e421. doi: 10.1371/journal.pntd.0000421.
12. Szaba F.M., Kummer L.W., Duso D.K., Koroleva E.P., Tumanov A.V., Cooper A.M., Bliska J.B., Smiley S.T., Lin J.S. TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$  but Not Perforin Are Critical for CD8 T Cell-Mediated Protection against Pulmonary *Yersinia pestis* Infection. *PLoS Pathog.*, 2014. Vol. 10, no. 5, e1004142. doi:10.1371/journal.ppat.1004142.
13. Wang X., Wang Z., Guo Z., Wei B., Tian F., Yu S., Wang H., Wang H., Yang R. Serum cytokine responses in primary pneumonic plague patients. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2011, Vol. 18, no. 1, pp.184-186.
14. Williamson E.D., Flick-Smith H.C., LeButt C., Rowland C.A., Jones S.M., Waters E.L., Gwyther R.J., Miller J., Packer P.J., Irving M. Human immune response to a plague vaccine comprising recombinant F1 and V antigens. *Infection and Immunity*, 2005, Vol. 73, no. 6, pp. 3598-3608.
15. Williamson E.D. The role of immune correlates and surrogate markers in the development of vaccines and immunotherapies for plague. *Advances in Preventive Medicine*, 2012. Article ID 365980, 7 p. doi: 10.1155/2012/365980.

---

**Авторы:**

**Клюева С.Н.** — к.б.н., научный сотрудник отдела иммунологии ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт „Микроб“», г. Саратов, Россия

**Бугоркова С.А.** — д.м.н., заведующая отделом иммунологии ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт „Микроб“», г. Саратов, Россия

**Щуковская Т.Н.** — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела иммунологии ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт „Микроб“», г. Саратов, Россия

**Санджиев Д.Н.** — руководитель Управления Роспотребнадзора по Республике Калмыкия, главный государственный санитарный врач по Республике Калмыкия, г. Элиста, Россия

**Authors:**

**Klyueva S.N.**, PhD (Biology), Research Associate, Department of Immunology, Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

**Bugorkova S.A.**, PhD, MD (Medicine), Head, Department of Immunology, Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

**Shchukovskaya T.N.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Main Research Associate, Department of Immunology, Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

**Sandzhiev D.N.**, Head, Rospotrebnadzor Administration for the Republic of Kalmykia, Main State Sanitary Doctor of the Republic of Kalmykia, Elista, Russian Federation

**Конушева С.В.** — заместитель руководителя  
Управления Роспотребнадзора по Республике Калмыкия,  
заместитель главного государственного санитарного  
врача по Республике Калмыкия, г. Элиста, Россия

**Савченко С.П.** — начальник отдела эпидемиологического  
надзора Управления Роспотребнадзора по Республике  
Калмыкия, г. Элиста, Россия

**Хасыкова Б.А.** — заместитель начальника  
Территориального отдела «Северо-Восточный»  
Управления Роспотребнадзора по Республике Калмыкия  
в Черноземельском районе, г. Элиста, Россия

**Щербакова С.А.** — д.б.н., заместитель директора  
по научной и экспериментальной работе ФКУЗ  
«Российский научно-исследовательский противочумный  
институт „Микроб“», г. Саратов, Россия

**Konusheva S.V.**, Deputy Head, Rosпотребнадзор  
Administration for the Republic of Kalmykia, Deputy Main  
State Sanitary Doctor of the Republic of Kalmykia, Elista,  
Russian Federation

**Savchenko S.P.**, Head, Epidemiology Surveillance  
Department, Rosпотребнадzor Administration in the Republic  
of Kalmykia, Elista, Russian Federation

**Khasykova B.A.**, Deputy Head, Territorial Department  
“North-East”, Rosпотребнадzor Administration in the Republic  
of Kalmykia, Elista, Russian Federation

**Shcherbakova S.A.**, PhD, MD (Biology), Deputy Director,  
Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov,  
Russian Federation

---

Поступила 31.05.2017

Отправлена на доработку 21.06.2017

Принята к печати 22.09.2017

Received 31.05.2017

Revision received 21.06.2017

Accepted 22.09.2017