
УЧАСТИЕ РАЗЛИЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ В ФОРМИРОВАНИИ ЗАЩИТЫ ОТ МЕНИНГОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ*

О.В. Котельникова, Е.Ю. Дрожжина,
О.М. Вольпина, Д.О. Короев, М.П. Филатова

Лаборатория синтетических вакцин
ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
ул. Миклухо-Маклая, 10/16, Москва, Россия, 117197

А.П. Аллилуев

Кафедра микробиологии
Медицинский факультет
Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 8, Москва, Россия, 117198

Целью настоящего исследования является изучение роли различных популяций лимфоцитов, принимающих участие в формировании иммунитета против менингококковой инфекции при иммунизации синтетическими пептидными фрагментами белков наружной мембраны менингококка серогруппы В.

Иммунизация мышей синтетическими пептидными фрагментами белков наружной мембраны менингококка вызывала выраженную защиту животных от заражения живой вирулентной культурой менингококков серогрупп А, В и С. Показана ведущая роль Т-лимфоцитов в защите мышей от этой инфекции. Анализ Т-клеточных популяций с помощью метода проточной цитофлюорометрии показал изменение численности $CD4^+$ и $CD8^+$ лимфоцитов на разных этапах иммуногенеза без изменения соотношения $CD4^+/CD8^+$. Увеличение числа этих лимфоцитов происходило в поздние сроки после иммунизации мышей. Данные литературы указывают на роль P_{og}A антигена в формировании Т-клеточного ответа. Тем не менее тип иммунного ответа на бактериальный менингит до сих пор до конца не ясен.

Ключевые слова: иммунизация, менингококки серогрупп А, В и С, Т-лимфоциты.

Показанная ранее высокая степень корреляции иммунного ответа на микробные антигены менингококков в опытах на мышах с иммуногенностью изучаемых препаратов для человека позволяет использовать эту модель для прогнозирования перспективности применения различных антигенов при создании противоменингококковых вакцин. Так, было показано, что уровень антител и число антителообразующих клеток у мышей, иммунизированных фракциями менингококкового А — полисахарида с различной молекулярной массой, коррелируют с уровнями бактерицидных и гемагглютинирующих антител у людей, вакцинированных теми же вакцинными препаратами [1].

Представлялось интересным, в этой связи, посмотреть реакцию клеточной составляющей иммунного ответа мышей при иммунизации пептидными фрагментами белков поверхностной мембраны менингококка серогруппы В, иммуноген-

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты № 06-04-48920 и № 06-04-08124-офи).

ная и протективная активность которых были показаны ранее [2, 3]. При многих инфекционных болезнях большое значение имеет формирование специфического клеточного иммунитета, существенную роль в котором играют цитотоксические Т-лимфоциты [4, 5]. Изучение Т- и В-клеточного ответа у людей при иммунизации голландскими гексавалентными везикулярными менингококковыми вакцинами показало, что белок PоrА ответственен за Т-клеточный ответ только после 1-й и 2-й иммунизации [6]. При анализе иммуногенной активности пептидных фрагментов белка PоrА, содержащих Т-клеточные эпитопы, на мышинной модели отмечено, что одни и те же участки белка могут стимулировать как В-, так и Т-клетки [7], результаты изучения Т-клеточного ответа у людей методом пролиферации с использованием синтезированных пептидных фрагментов пориновых и опалисцирующих белков поверхностной мембраны менингококка показали, что величина Т-клеточного ответа убывает в ряду белков: Ора > Орс > PоrА > PоrВ [8]. Вакцинация людей норвежской везикулярной вакциной вызывала усиление Т-клеточной пролиферации, сильный и устойчивый первичный Т-клеточный ответ, усиление ответа на вторичную вакцинацию и возрастание количества Т-клеток памяти [9]. Таким образом данные литературы указывают на роль PоrА антигена в формировании Т-клеточного ответа. Тем не менее тип иммунного ответа на бактериальный менингит до сих пор до конца не ясен.

Материалы и методы. Выбранные для иммунизации мышей синтетические пептидные фрагменты белков наружной мембраны менингококка обладали, как было показано ранее [2], выраженной протективной активностью в опытах прямого заражения мышей живой вирулентной культурой как в отношении различных штаммов менингококка серогруппы В, так и менингококков серогрупп А и С.

Мышей-доноров линии СВА/Ла иммунизировали пептидами подкожно в дозе 100 мкг пептида однократно с полным адьювантом Фрейнда (ПАФ) или двукратно с интервалом 45 дней. Повторную иммунизацию проводили с неполным адьювантом Фрейнда (НАФ). Для изучения свойств иммунных лимфоцитов при постинфекционном иммунитете мышам вводили сублетальную дозу ($0,25 \cdot 10^6$ м.т.) менингококковой культуры серогруппы В штамма Н44/76 по той же схеме — «переболевшие» мыши. Роль различных популяций лимфоцитов в защите от менингококковой инфекции изучали методом адаптивного переноса лимфоцитов от «переболевших» менингококком и (или) иммунизированных пептидами животных интактным реципиентам через 1 месяц после последней иммунизации [3]. Популяцию Т-лимфоцитов получали отрицательной селекцией в результате адсорбции макрофагов на пластике и удаления В-клеток. Т-клеточные субпопуляции выделяли с использованием магнитных частиц с иммобилизованными на них анти-CD4 и анти-CD8 антителами. Популяционный состав взвеси оценивали методом проточной цитометрии [10, 11]. Контролем служили лимфоциты мышей-доноров после введения им только адьюванта по той же схеме, что и при иммунизации пептидами. Выход живых лимфоцитов составлял 83—87%. Полученные взвеси лимфоцитов вводили мышам-реципиентам внутривенно. Через 3 часа после пе-

рениса клеток мышей заражали живой вирулентной культурой менингококком серогруппы В штамм Н44/76 в дозе $0,25 \cdot 10^6$ м.т.

Через 4 часа после заражения у мышей забирали кровь из ретроорбитального синуса и высевали на чашки с плотной питательной средой. Эффект защиты оценивали через 18 часов по числу колониеобразующих клеток (КОЕ) в крови реципиентов или по числу выживших животных на 5-й день после заражения относительно этих показателей в контрольной группе. Защищенность животных от заражения менингококком после переноса им различных популяций лимфоцитов позволила оценить роль последних на определенных этапах формирования иммунитета к данной инфекции.

Пролиферативный ответ лимфоцитов оценивали с использованием мышиных CD-FITC конъюгатов на 7—12-й день после иммунизации мышей по сравнению с пролиферацией лимфоцитов мышей, получивших только адъювант. Для этого после стимуляции пептидом и ConA спленоциты отмывали, суспендировали в PBS-1%FCS и добавляли FITC-меченые конъюгаты CD-3, CD-4, CD-8, CD-19 в концентрации, указанной выпускающей фирмой (Caltag). Окрашивание проводили в течение 30 минут при комнатной температуре.

Обработку клеток параформом проводили в течение 20 мин. при $+4$ °С. Перед ДНК-анализом на цитофлюориметре на суспензию клеток в PBS наслаивали холодный этанол (1 : 2), встряхивали на шейкере и выдерживали 1 час при $+4$ °С.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы «Probit Analysis».

Результаты исследования. Для отработки дозы переносимых клеток использовали лимфоциты мышей после однократного введения им сублетальной ($0,25 \cdot 10^6$ м.к.) дозы менингококков серогруппы В (табл. 1).

Таблица 1

Протективная активность Т-лимфоцитов в зависимости от дозы вводимых клеток

Доноры клеток	Доза перенесенных лимфоцитов, 10^6			
	20	10	5	2
Неиммунные	9/10*	9/10	10/10	10/10
«Переболевшие»	3/10	3/10	4/10	8/10

Примечание: * — число погибших мышей /число зараженных мышей.

При переносе Т-лимфоцитов от интактных доноров не наблюдалось значимой защиты мышей-реципиентов ни от одной из использованных доз. Т-лимфоциты от «переболевших» доноров в дозах $10 \cdot 10^6$ и $20 \cdot 10^6$ защищали 70% реципиентов. В дальнейшей работе при переносе использовали дозу $10 \cdot 10^6$ лимфоцитов.

При переносе Т-лимфоцитов через 1 месяц после однократной иммунизации мышей-доноров изучаемыми пептидами мышам-реципиентам уровень бактериемии у всех животных снижался. Защита мышей от заражения живой культурой менингококка составляла от 41 до 87% в зависимости от характера пептида (табл. 2).

Минимальную защиту обеспечивали Т-лимфоциты мышей, иммунизированных пептидом 40-61 белка NspA (41%) и пептидом 346-392 белка PоrA (51%).

Таблица. 2

Уровень бактериемии в крови реципиентов иммунных лимфоцитов при заражении их менингококком серогруппы В в зависимости от кратности иммунизации доноров

Белок	Пептид	Число КОЕ *	
		1 имм.**	2 имм.
PоrA	118-143	29 ± 9	38 ± 7
	306-332	14 ± 6	19 ± 8
	346-392	49 ± 4	20 ± 8
OpaB	30-51	13 ± 6	31 ± 11
	131-150	15 ± 5	65 ± 8
NspA	40-61	59 ± 9	31 ± 4
Адьювант		100 ± 9	100 ± 7

Примечание: * — число КОЕ при заражении реципиента менингококком; ** — число иммунизаций донора.

Результаты повторной иммунизации мышей этими пептидами позволили разделить пептидные фрагменты на три группы. Для пептидов 118-143 и 306-332 (белок PоrA) лимфоциты двукратно иммунизированных мышей значительно отличались по протективной активности от лимфоцитов животных, иммунизированных однократно. Для пептидов 346-392 (белок PоrA) и 40-62 (белок NspA) перенос лимфоцитов от двукратно иммунизированных доноров вызывал более выраженную защиту. Для пептидов 30-51 и 131-150 (белок OpaB) протективная активность лимфоцитов снижалась после повторной иммунизации. Полученные данные говорят о формировании различных популяций лимфоцитов после повторной иммунизации мышей пептидами в зависимости от их происхождения (белки PоrA, OpaB, NspA).

Перенос Т-лимфоцитов от мышей, иммунизированных пептидами 118-143 и 306-332, обеспечивал высокую защиту мышей (70 и 68% соответственно) от заражения менингококком серогруппы В до 21 месяца (срок наблюдения)

Выделение и перенос отдельных популяций CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов от иммунизированных пептидами доноров интактным реципиентам показало (рис. 1), что через 1 месяц после ревакцинации уровень бактериемии после заражения менингококком как доноров, так и реципиентов CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов, доноры которых были иммунизированы пептидом 306-332, значительно снижался по сравнению с контролем. При переносе лимфоцитов, доноры которых были иммунизированы пептидом 273-292, только CD8⁺ клетки значительно снижали уровень бактериемии.

В то же время и сами доноры, иммунизированные пептидом 273-292, были защищены слабее.

По данным проточной цитометрии (рис. 2) отмечалось увеличение числа цитотоксических Т-лимфоцитов на этом сроке после иммунизированных обоими пептидами по сравнению с контрольными животными. Нарастание CD4⁺ клеток наблюдалось только при иммунизации пептидом 306-332. Соответственно соотношение CD4⁺ / CD8⁺ для пептида 306-332 сохранялось на уровне контрольных животных (2,8), а для мышей, иммунизированных пептидом 273-292, это соотношение снизилось до 1,72. Можно предположить, что полученный факт свидетельствует о стимуляции этим пептидом непосредственно цитотоксического механизма защиты от этой инфекции, тогда как в случае пептида 306-332 принимают участие обе популяции лимфоцитов, вовлекая в процесс защиты гуморальный фактор иммунитета опосредованно через Т-хелперные лимфоциты. Тем более, что, как было показано ранее, способностью к антителообразованию обладает только пептид 306-332.

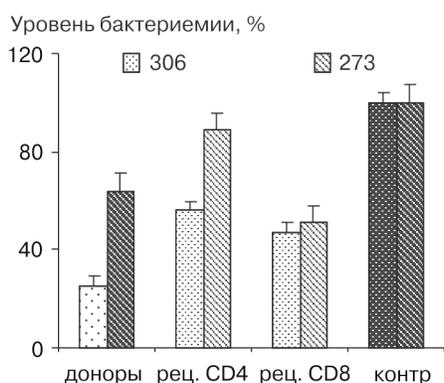


Рис. 1. Уровень бактериемии доноров и реципиентов после заражения менингококком

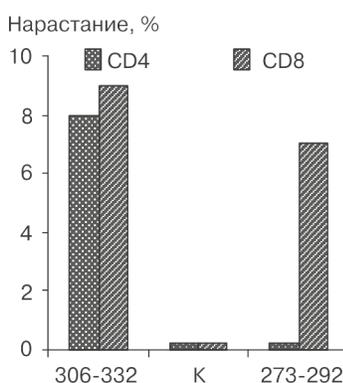


Рис. 2. Уровень CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов у мышей через 1 месяц после иммунизации

Показателем специфичности иммунного ответа на пептиды послужили результаты антиген-специфической пролиферации Т-лимфоцитов у мышей, иммунизированных пептидами трех различных белков поверхностной мембраны менингококка: 118-143 (белок PorA), 30-51 (белок OpaB) и 40-62 (белок NspA) при стимуляции их различными дозами антигена (рис. 3). Контролем служили лимфоциты неиммунных мышей (К), прошедшие ту же обработку, и иммунные лимфоциты, обработанные Con A. Для пептидов 118-143 и 40-62 индекс стимуляции составлял 3,5. Ни одна из использованных доз пептида 30-51 не вызывала пролиферативного ответа иммунных лимфоцитов. Более того, наблюдалась тенденция к супрессорному эффекту. Эти результаты согласуются с предыдущими данными по переносу лимфоцитов от одно- и двукратно иммунизированных доноров, а также с результатами по протективной активности изучаемых пептидных фрагментов в опытах прямой защиты мышей от заражения живой вирулентной культурой менингококка [2, 3].

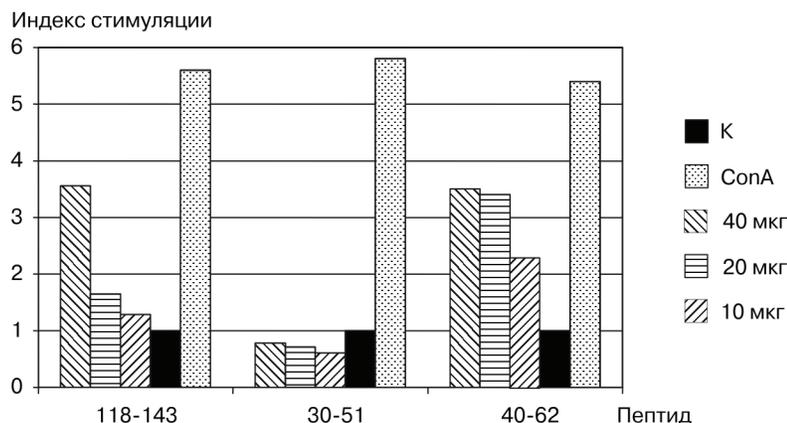


Рис. 3. Зависимость пролиферативной активности лимфоцитов от стимулирующей дозы и свойств пептида

Таким образом выявлены принципиальные различия в механизмах формирования защиты от менингококковой инфекции при иммунизации мышей пептидными фрагментами белков наружной мембраны менингококка, что позволяет дифференцированно подходить к выбору пептидных фрагментов при конструировании вакцин против менингококковой инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Аллилуев А.П., Котельникова О.В., Кувакина В.И., Бобылева Г.В., Гофман И.Л., Казьмина Ю.Г. Взаимосвязь иммунологической эффективности сухой полисахаридной менингококковой группы А вакцины и молекулярных параметров группового А-полисахарида // ЖМЭИ. — 1995. — Т. 4. — С. 67—7.
- [2] Котельникова О.В., Чибискова О.В., Феоктистов К.М., Королева И.С., Несмеянов В.А., Аллилуев А.П., Короев Д.О., Вольпина О.М., Иванов В.Т. Конструирование противоменингококковых вакцин на основе синтетических пептидов белков поверхностной мембраны менингококка серогруппы В // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2005. — Т. 25. — № 6. — С. 28—32.
- [3] Котельникова О.В., Чибискова О.В., Несмеянов В.А., Аллилуев А.П., Вольпина О.М., Короев Д.О., Жмак М.Н., Титова М.А., Иванов В.Т. Протективные свойства синтетических пептидов наружной мембраны менингококков // БЭБИМ. — 2005. — Т. 139. — № 5. — С. 553—556.
- [4] Ярилин А.А. Основы иммунологии. — М.: Медицина, 1999. — Т. 1—3.
- [5] Ярилин А.А., Донецкова А.Д. Естественные регуляторные Т-клетки и фактор FOXP3 // Иммунология. — 2006. — Т. 37. — С. 76—188.
- [6] Rouppe Van der Voort E., Van der Ley P., Van der Biezen J., George S. et al. Specificity of human bactericidal antibodies against PorA P1.7,16 induced with the hexavalent meninococcal outer membrane vesicle vaccine // Infect. Immun. — 1996. — V. 64. — P. 2745—2751.
- [7] Дельвиг А.А., Семёнов Б.Ф., Розенквист Э., Робинсон Д.Г. Neisseria meningitidis: от антигенной структуры к новому поколению вакцин. — М.: Медицина, 2000.
- [8] Delvig A., Donders E.M.L.M., Achtman, Poolman J.T. et al. T-cell response to outer membrane proteins of Neisseria meningitidis: Comparative study of the Opa, Opc, and PorA proteins // Infect. Immun. — 1996. — P. 298—304.

- [9] *Oftung F., Naess L.M., Wetzler L.M., Aase A., Hanenberg B. et al.* Antigen-specific responses in humans after intranasal immunization with a meningococcal serogroup B outer membrane vesicle vaccine // *Infect. Immun.* — 1999. — V. 67. — P. 921—927.
- [10] *Пинегин Б.В., Ярилин А.А., Симонова А.В. и др.* Применение проточной цитометрии для оценки функциональной активности иммунной системы человека. — М., 2001. — С. 56.
- [11] *Ярилин А.А.* Гомеостатические процессы в иммунной системе. Контроль численности лимфоцитов // *Иммунология.* — 2004. — Т. 25. — С. 312—320.

PARTICIPATION OF VARIOUS POPULATIONS LYMPHOCYTES IN FORMATION OF PROTECTION FROM MENINGOCOCCOSIS

**O.V. Kotelnikova, E.J. Drozzina, O.M. Volpina,
D.O. Koroev, M.P. Filatova**

Department of Synthetic vaccines
Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS
Miklukho-Maklaya str., 10/16, Moscow, Russia, 117997

A.P. Alliluev

Department of Microbiology
Peoples' Friendship University of Russia
Miklukho-Maklaya str., 8, Moscow, Russia, 117198

Immunization of mice by synthetic peptides fragments of meningococcus external membrane fibers caused the expressed protection of animals against infection caused by live virulent meningococcus culture serogroup A, B and C. There are leading part T-lymphocytes in protection of mice from this infection here. The analysis of T-cellular populations by means of a method flowing cytophluorometrics has shown increase CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes without change of parity CD4⁺/CD8⁺. The increase in number of these lymphocytes occurred in late terms after immunization of mice.

Key words: immunization, meningococcus serogroup A, B and C, T-lymphocytes