

# ИНДУКЦИЯ Т-ЛИМФОЦИТОВ С ФЕНОТИПОМ КЛЕТОК ПАМЯТИ В ЛЕГКИХ МЫШЕЙ ПРИ ИНТРАНАЗАЛЬНОЙ ИММУНИЗАЦИИ ГРИППОЗНЫМ ВЕКТОРОМ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИМ МИКОБАКТЕРИАЛЬНЫЕ БЕЛКИ

А.-П.С. Шурыгина<sup>1</sup>, Н.В. Заболотных<sup>2</sup>, Т.И. Виноградова<sup>2</sup>, К.А. Васильев<sup>1</sup>,  
Ж.В. Бузицкая<sup>1</sup>, М.А. Стукова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> ФГБУ Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Совершенствование специфической профилактики туберкулеза остается одной из приоритетных задач фтизиатрии. Применение схем «прайм-буст» вакцинации, направленных на поддержание специфического иммунитета на адекватном уровне и формирование длительной протекции, основано на последовательном применении вакцины БЦЖ и вакцинных кандидатов, включающих протективные микобактериальные белки. Разработка новых подходов к профилактике туберкулеза требует понимания того, каким образом происходит формирование противотуберкулезного иммунного ответа и какие механизмы обеспечивают протекцию при туберкулезной инфекции. Так как туберкулез является инфекцией, передаваемой аэрогенным путем, эффективность вакцинации во многом зависит от формирования мукозального иммунитета с образованием долгоживущих и функционально активных Т-лимфоцитов с фенотипом клеток памяти в области дыхательных путей. Ранее нами показано, что включение в схему вакцинации бустирующей интраназальной иммунизации гриппозным вектором, экспрессирующим микобактериальные белки ESAT-6 и Ag85A (Flu/ESAT-6\_Ag85A), привело к выраженному повышению протективного эффекта БЦЖ по совокупности основных показателей тяжести экспериментальной туберкулезной инфекции. Целью данной работы являлось исследование влияния интраназальной иммунизации гриппозным вектором Flu/ESAT-6\_Ag85A на формирование антигенспецифических центральных и эффекторных клеток памяти в структуре CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и изучение цитокин-продуцирующей активности эффекторных Т-клеток (T<sub>EM</sub>) при использовании гриппозного вектора в стандартной и «прайм-буст» схемах вакцинации у мышей. Показано, что интраназальная иммунизация гриппозным вектором способствует увеличению доли антигенспецифических центральных CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти (T<sub>CM</sub>) в пуле активированных лимфоцитов легких и селезенки иммунизированных мышей, достигая статистически значимой разницы с группой БЦЖ по процентному содержанию CD4<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> селезенки ( $p < 0,01$ ). В отличие от БЦЖ, вакцинация исследуемой кандидатной вакциной сопровождается аккумуляцией высококодифференцированных CD8 клеток-эффекторов в легких — органе-мишени развития туберкулезной инфекции. Сравнительная оценка

**Адрес для переписки:**

Стукова Марина Анатольевна  
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 15/17,  
НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева.  
Тел.: 8 (812) 499-15-21 (служебн.); +7 921 308-97-07 (моб.).  
E-mail: marina.stukova@influenza.spb.ru

**Contacts:**

Marina A. Stukova  
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Prof. Popova str., 15/17,  
Smorodintsev Research Institute of Influenza.  
Phone: +7 (812) 499-15-21 (office); +7 921 308-97-07 (mobile).  
E-mail: marina.stukova@influenza.spb.ru

**Библиографическое описание:**

Шурыгина А.-П.С., Заболотных Н.В., Виноградова Т.И., Васильев К.А.,  
Бузицкая Ж.В., Стукова М.А. Индукция Т-лимфоцитов с фенотипом  
клеток памяти в легких мышей при интраназальной иммунизации  
гриппозным вектором, экспрессирующим микобактериальные белки //  
Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 3. С. 506–514. doi: 10.15789/2220-  
7619-IOL-1232

**Citation:**

Shurygina A.-P.S., Zabolotnykh N.V., Vinogradova T.I., Vasiliev K.A.,  
Buzitskaya Zh.V., Stukova M.A. Lung memory T-cell response in mice  
following intranasal immunization with influenza vector expressing  
mycobacterial proteins // Russian Journal of Infection and Immunity =  
Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 3, pp. 506–514. doi: 10.15789/2220-  
7619-IOL-1232

поствакцинального иммунного ответа клеточного типа при иммунизации вакцинным кандидатом на основе гриппозного вектора (интраназально) и вакциной БЦЖ (подкожно) показала преимущество мукозальной вакцинации в формировании функционально активных субпопуляций эффекторных CD4 и CD8 Т-лимфоцитов (CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>low</sup>) в легких, секретирующих IL-2, и полифункциональных клеток, способных к выработке двух (IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$ ; IFN $\gamma$  и IL-2) и трех (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  и IL-2) цитокинов. Благодаря более выраженной эффекторной функции полифункциональных Т-лимфоцитов, данные клетки могут рассматриваться в качестве потенциальных иммунологических маркеров протективного иммунитета при туберкулезе.

**Ключевые слова:** гриппозный вектор, ESAT-6, Ag85A, вакцина БЦЖ, Т-клетки памяти, проточная цитометрия.

## LUNG MEMORY T-CELL RESPONSE IN MICE FOLLOWING INTRANASAL IMMUNIZATION WITH INFLUENZA VECTOR EXPRESSING MYCOBACTERIAL PROTEINS

Shurygina A.-P.S.<sup>a</sup>, Zabolotnykh N.V.<sup>b</sup>, Vinogradova T.I.<sup>b</sup>, Vasiliev K.A.<sup>a</sup>, Buzitskaya Zh.V.<sup>a</sup>, Stukova M.A.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>b</sup> St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** Improving specific prevention of tuberculosis continues to be a top priority in phthisiology. “Prime-boost” vaccination schemes aim to maintain adequate levels of specific immunity while forming long-term protection. They are based on sequential use of BCG vaccine and new vaccine candidates expressing protective mycobacterial proteins. The development of new tuberculosis prevention approaches requires an understanding of how the anti-tuberculosis immune response forms and which mechanisms provide TB protection. Since tuberculosis is an airborne infection, vaccine effectiveness largely depends on mucosal immunity based on the formation of long-lived, functionally-active memory T-lymphocytes in the respiratory tract. We have previously shown that the influenza vector expressing ESAT-6 and Ag85A mycobacterial proteins (Flu/ESAT-6\_Ag85A) in vaccination scheme of intranasal boost immunization resulted in significant increase of BCG's protective effect according to key indicators aggregate data in experimental tuberculosis infection. The aim of this work was to study the effect of intranasal immunization with the Flu/ESAT-6\_Ag85A influenza vector on the formation of antigen-specific central and effector memory T cells and the cytokine-producing activity of effector T cells (TEM) in BCG standard and “BCG prime — influenza vector boost” vaccination schemes in mice. Intranasal immunization with the influenza vector has been shown to increase the proportion of antigen-specific CD4<sup>+</sup> central memory T cells (TCM) in the pool of activated lymphocytes of lung and spleen reaching significant differences from the BCG group in the percentage of spleen CD4<sup>+</sup> TCM ( $p < 0.01$ ). In contrast to BCG, vaccination with the studied vaccine candidate was accompanied by accumulation of highly differentiated CD8 effector cells in lung, the target organ during tuberculosis infection. Comparative evaluation of the cell-mediated, post-vaccine immune response after immunization with influenza-vector-based vaccine candidate (intranasal/mucosal) or BCG vaccine (subcutaneous) showed advantages in the mucosal group: in formation of functionally active subpopulations of effector CD4 and CD8 T lymphocytes (CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>low</sup>) in lungs secreting IL-2 as well as polyfunctional cells capable of coproducing two cytokines (IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$  or IFN $\gamma$ /IL-2) or three cytokines (IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$ /IL-2). Due to their more pronounced effector function, polyfunctional T-lymphocytes can be considered to be potential immunological markers of protective immunity in tuberculosis.

**Key words:** influenza vector, ESAT-6\_Ag85A, BCG vaccine, memory T cells, flow cytometry.

## Введение

Разработка путей повышения эффективности специфической профилактики туберкулеза по-прежнему остается одной из приоритетных задач фтизиатрии, что обусловлено, в частности, широким распространением туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью, резистентного к терапии эффективными противотуберкулезными препаратами. При исследовании иммунного ответа клеточного типа, обеспечивающего формирование защиты от туберкулеза, особое значение придается анализу влияния профилактической вакцинации на генерацию, жизнеспособность и функциональную активность Т-клеток памяти, поскольку угасание напряженности поствакцинального иммунитета при вакцинации БЦЖ (BCG, Bacillus Calmette–Guérin) связывают

именно с неспособностью стандартной вакцины стимулировать образование долгоживущих «центральных» Т-клеток памяти. БЦЖ индуцирует преимущественно эффекторные клетки памяти (T<sub>EM</sub>) фенотипа CD4<sup>+</sup>, постепенно исчезающие в течение 10–15 лет, что приводит к бесконтрольности экзогенной реинфекции [9, 12]. Кроме того, за счет преимущественной стимуляции CD4 Т-клеток при вакцинации БЦЖ нарушается оптимальное сочетание CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеточных звеньев иммунной системы, необходимое для эффективной протекции [17]. Угасание протективного эффекта вакцинации БЦЖ возможно обусловлено и цитокин-продуцирующим потенциалом Т-клеток памяти, характеризующим их функциональную активность и тесно связанным с эффективностью новых схем специфической иммунизации [8, 9, 13].

В данной работе оценивался ответ на иммунизацию рекомбинантным гриппозным вектором с модифицированным геном NS1, экспрессирующим химерный микобактериальный белок ESAT-6\_Ag85A (Flu/ESAT-6\_Ag85A) и вызывающим в зоне вирусной репликации продукцию интерферонов первого типа и широкого спектра провоспалительных цитокинов, способствующих поляризации иммунного ответа в сторону Th1-звена [15]. За счет интраназального введения рекомбинантный гриппозный вектор обеспечивает формирование иммунного ответа на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей, что имеет большое значение при туберкулезе вследствие аэрогенного пути заражения при данной инфекции.

С целью формирования длительного протективного поствакцинального иммунного ответа в последние годы активно исследуется схема «прайм-буст» вакцинации, в которой для праймирования иммунного ответа используется БЦЖ, а для последующего бустирования — вакцины нового поколения. Результативность гетерологичной вакцинации при туберкулезной инфекции показана при бустерной иммунизации несколькими кандидатами, экспрессирующими протективные микобактериальные антигены на основе субъединичных и различных вариантов векторных вакцин [11, 13, 18]. Нами ранее получен выраженный протективный эффект и активация Th1 иммунитета при применении в качестве «буст»-вакцины Flu/ESAT-6\_Ag85A [1].

В данной работе исследовали влияние иммунизации аттенуированным гриппозным вектором, экспрессирующим белки ESAT-6 и Ag85A *M. tuberculosis* (Flu/ESAT-6\_Ag85A), на содержание антигенспецифических центральных и эффекторных клеток памяти в структуре CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и цитокин-продуцирующую активность Т-клеток памяти с фенотипом CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>low</sup>.

## Материалы и методы

*Лабораторные животные.* Исследования выполнены согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 266 МЗ РФ от 19.06.2003). В работе были использованы самцы мышей линии C57/black/6 в возрасте 6–8 недель. Процедуры, проводимые с животными, были согласованы с Комиссией по биоэтике ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России на предмет соответствия регулирующим актам.

*Вакцинный штамм.* В работе использован вакцинный штамм Flu/ESAT-6\_Ag85A, полученный ранее (Kuznetsova I. и соавт., 2014). В рекомбинантном гене NS (гес NS) вируса гриппа после последовательности, кодирующей первые

106 аминокислот NS1 белка (нормальный размер белка NS1 составляет 230 аминокислотных остатков), следует последовательность, кодирующая микобактериальные белки. При этом ESAT-6 экспрессируется в шивке с NS1 белком (фьюжен-белок), а Ag85A отщепляется при помощи сайта протеолитического расщепления. Для обеспечения секреции второго белка-вставки во внешнюю среду зараженной клетки перед последовательностью, кодирующей белок, введена последовательность, кодирующая SP-IgK-сигнальный пептид иммуноглобулина.

*Иммунизация животных.* Мышей линии C57/black/6 иммунизировали Flu/ESAT-6\_Ag85A интраназально (30 мкл, 6,0 lg ТИД<sub>50</sub>/мышь, однократно) под легкой эфирной анестезией. Животным контрольной группы вводили эквивалентный объем фосфатно-буферного раствора (плацебо). В качестве препарата сравнения использовали вакцину БЦЖ (10<sup>5</sup> КОЕ/мышь подкожно, однократно). В схеме гетерологичной вакцинации «буст»-иммунизацию мышей Flu/ESAT-6\_Ag85A (30 мкл, 6,0 lg ТИД<sub>50</sub>/мышь, однократно) проводили через 4 месяца после праймирования мышей БЦЖ (10<sup>5</sup> КОЕ/мышь подкожно, однократно). Контролем служили мыши, вакцинированные только БЦЖ.

*Оценка поствакцинального иммунного ответа.* Поствакцинальный иммунный ответ оценивали методом внутриклеточного окрашивания цитокинов в суспензии клеток интерстиция легких через 9 и 21 день после иммунизации животных. После перфузии правого предсердия 10 мл холодного фосфатного буфера (DPBS), у животных производили забор органов. Далее предварительно обработанные ферментами легкие (45 мин, 37°C раствор коллагеназы (Sigma) 0,5 мг/мл и ДНКазы I (Sigma) 10 мкг/мл) подвергали механической диссоциации с помощью гомогенизатора «Tissue Lyser II». После чего, гомогенаты тканей пропускали через 70 мкм клеточный фильтр. Клетки однократно отмывали в DPBS, содержащем 5% фетальной телячьей сыворотки (Gibco), 1% раствора пенициллина/стрептомицина (Gibco), с добавлением 50 мкМ 2-Меркаптоэтола (Sigma). Лизис эритроцитов осуществляли АСК буфером (0,15 М NH<sub>4</sub>Cl, 10 мМ NaHCO<sub>3</sub>, 1 мМ Na<sub>2</sub>EDTA), с последующей отмывкой клеток в среде RPMI 1640 (Gibco), содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки (Gibco), 1% раствора пенициллина/стрептомицина (Gibco). После подсчета, клетки рассеивали в плоскостонные культуральные 96-луночные планшеты (Nunc) с плотностью 1 × 10<sup>6</sup> клеток/луночка.

*Пробоподготовка и иммунофлуоресцентное окрашивание.* Клетки стимулировали рекомбинантными белками ESAT-6 и Ag85A (Novus Biologicals) 5 мкг/мл в присутствии костиму-

лирующих антител к CD28 (BD Biosciences) при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Культуральную среду и РМА (Sigma) использовали в качестве отрицательного и положительного контроля соответственно. После 12 часов инкубации в лунки добавляли ингибитор белкового транспорта GolgiPlug (BD Biosciences) и продолжали стимуляцию еще в течение 4 часов. Далее клетки переносили в V-донные 96-луночные планшеты (Nunc), в которых производили последовательное окрашивание ZombiRed (BioLegend) и антителами к поверхностным клеточным маркерам CD3-PECy7 (BioLegend), CD4 или CD8-PerCPCy5.5 (BD Biosciences), CD 44-BV510 (BioLegend), CD62L-APCCy7 (BioLegend). Для снижения вероятности неспецифического окрашивания добавляли реагент TrueStain (BD Biosciences).

Для окрашивания внутриклеточных цитокинов использовали антитела к IFN $\gamma$ -FITC, IL-2-PE и TNF $\alpha$ -BV421 (BioLegend). Фиксацию и пермеабиллизацию клеток осуществляли с помощью набора «BD Biosciences Cytotfix/Cytoperm», согласно инструкции производителя. Сбор данных проводили на проточном цитометре «BD Sauto II» в программе «BD FACS Diva» (BD Biosciences).

**Анализ данных проточной цитометрии.** Анализ данных проточной цитометрии осуществляли в программном обеспечении BD FACS Diva (BD Biosciences) и/или Kaluza 1.3 (Beckman Coulter).

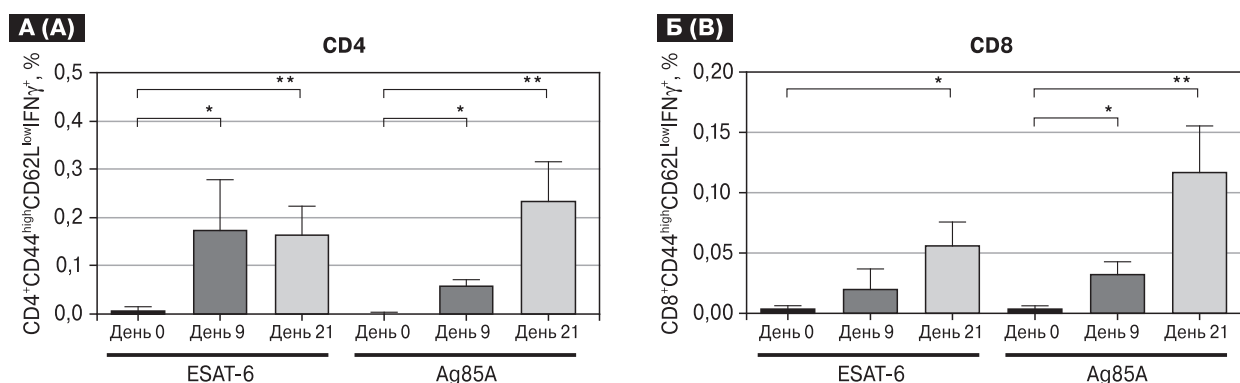
**Статистическую обработку** данных проводили в программе GraphPad Prizm 6.0. В зависимости от условий эксперимента использовали

непараметрический критерий Манна–Уитни или параметрический критерий Стьюдента (t-тест). Достоверными считали различия при  $p < 0,05$ .

## Результаты

**Формирование IFN $\gamma$ -продуцирующих эффекторных Т-клеток памяти.** Генерация эффекторных Т-лимфоцитов, продуцирующих IFN $\gamma$  (Th1), и их накопление в очаге инфекции (легкие) является одним из ключевых механизмов протективного иммунитета к *M. tuberculosis*. В этой связи на первом этапе изучалось влияние интраназальной иммунизации мышей гриппозным вектором Flu/ESAT-6\_Ag85A на образование популяций IFN $\gamma$ -продуцирующих Т-лимфоцитов с поверхностными маркерами эффекторных Т-клеток памяти CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>low</sup> (T<sub>EM</sub>).

Формирование пула специфических IFN $\gamma$ -продуцирующих лимфоцитов в Т-клеточных популяциях гомогенатов легких мышей, иммунизированных Flu/ESAT-6\_Ag85A, по сравнению с группой плацебо обнаружено уже на 9-й день после вакцинации (рис. 1). На 21-й день отмечено дальнейшее повышение процентного содержания IFN $\gamma$ -секретирующих CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> клеток в ответ на оба специфических индуктора (микобактериальные белки ESAT-6 и Ag85A), достигающее достоверных различий с контрольной группой. Именно этот срок наблюдения выбран для дальнейших исследований.



**Рисунок 1. Продукция IFN $\gamma$  эффекторными Т-клетками памяти с фенотипом CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>low</sup> у мышей C57/black/6 через 9 и 21 день после однократной интраназальной вакцинации Flu/ESAT-6\_Ag85A**

Figure 1. IFN $\gamma$  immune response of CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>low</sup> effector memory T-cells in C57/black/6 mice 9 and 21 days after a single intranasal vaccination with Flu/ESAT-6\_Ag85A

**Примечание.** Процентное содержание IFN $\gamma$  продуцирующих T<sub>EM</sub> клеток в структуре CD4<sup>+</sup> (A) и CD8<sup>+</sup> (B) Т-лимфоцитов легких мышей C57/black/6 в ответ на специфическую стимуляцию рекомбинантными белками ESAT-6 и Ag85A (5 мкг/10<sup>6</sup> клеток). Данные представлены как среднее + ошибка среднего для каждой группы. \* —  $p < 0,05$ , \*\* —  $p < 0,005$  (непараметрический критерий Манна–Уитни).

Note. The percentage of the IFN $\gamma$ -producing T<sub>EM</sub> cells from the total number of effector CD4<sup>+</sup> (A) and CD8<sup>+</sup> (B) T-cells in the lungs of C57/black/6 mice in response to specific stimulation by recombinant proteins ESAT-6 and Ag85A (5  $\mu$ g/10<sup>6</sup> cells) is shown. Data are presented as mean + standard error of mean for each group. \* —  $p < 0.05$ , \*\* —  $p < 0.005$  (non-parametric Mann–Whitney test).

**Фенотипические характеристики Т-клеток памяти легких в ответ на введение гриппозного вектора Flu/ESAT-6\_Ag85A.** Иммунофенотипирование пула активированных лимфоцитов легких проводили через 21 день после иммунизации мышей C57black/6 вектором Flu/ESAT-6\_Ag85A либо БЦЖ, определяя уровень экспрессии на поверхности лимфоцитов молекул CD44 (маркер Т-клеток памяти у мышей) и CD62L (рецептор хомминга, способствующий миграции Т-клеток во вторичные лимфоидные органы). Это позволило оценить эффекторные (T<sub>EM</sub>) и центральные (T<sub>CM</sub>) Т-клетки памяти с фенотипом CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>low</sup> и CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>high</sup> соответственно. Поскольку БЦЖ не содержит ранний секреторный антиген ESAT-6, в качестве специфического индуктора использовали белок Ag85A.

Обнаружено, что вакцинация Flu/ESAT-6\_Ag85A значимо повысила относительное число клеток с фенотипом эффекторных клеток памяти (T<sub>EM</sub>) в пуле CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов легких мышей (табл. 1), как в сравнении с группой плацебо (41,41±5,49% против 27,88±4,99%, p < 0,001), так и с группой БЦЖ (41,41±5,49% против 26,54±2,36%, p < 0,0001). В то же время у мышей, вакцинированных гриппозным вектором и БЦЖ, практически не изменилась доля CD4<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> клеток, которая составляла 40,25±4,84% для группы плацебо, 41,5±6,72% и 37,95±2,11% для групп, вакцинированных гриппозным вектором и БЦЖ соответственно.

Анализ субпопуляций Т-лимфоцитов с фенотипом центральных Т-клеток памяти (T<sub>CM</sub>) в пуле CD4<sup>+</sup> лимфоцитов селезенки мышей, иммунизированных Flu/ESAT-6\_Ag85A, вы-

явил самое высокое содержание T<sub>CM</sub> клеток памяти (6,66±1,01%), статистически значимо превышавшее значения группы плацебо (p < 0,008), и группы мышей, вакцинированных БЦЖ (p < 0,01). При этом в легких, где по сравнению с группой плацебо (2,99±0,23%) в обеих группах вакцинированных мышей доля CD4<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> лимфоцитов была на значительно более высоком уровне (4,31±0,41% для группы гриппозного вектора и 4,67±1,37% для группы БЦЖ, p < 0,0001, p < 0,01 соответственно), достоверных различий в процентном содержании T<sub>CM</sub> между группами вакцинированных животных обнаружено не было. В CD8<sup>+</sup> субпопуляции Т-лимфоцитов по доле T<sub>CM</sub> во всех опытных группах мышей ни в гомогенатах легких, ни в селезенке различий зарегистрировано не было.

**Внутриклеточная продукция IFN $\gamma$ , IL-2 и TNF $\alpha$  антигенспецифическими CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> эффекторными Т-клетками памяти в ответ на введение гриппозного вектора Flu/ESAT-6\_Ag85A или БЦЖ.** Сравнение формирования цитокинпродуцирующих Т-клеток памяти с фенотипом CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>low</sup> в ответ на специфическую стимуляцию при вакцинации Flu/ESAT-6\_Ag85A и БЦЖ проведено на 21 день после однократной иммунизации. В качестве специфического индуктора использовали белок Ag85A.

Выявлено, что в группе БЦЖ-вакцинированных мышей в пуле CD4<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> клеток легких доминируют клетки, секретирующие только один цитокин: IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  или IL-2 (рис. 2). Также присутствуют минорные популяции клеток, секретирующих 2 цитокина: IFN $\gamma$  и IL-2; TNF $\alpha$  и IL-2. В структуре CD8<sup>+</sup> полифункциональных клеток, секретирующих 2 и 3 цитоки-

**Таблица 1. Процент эффекторных (T<sub>EM</sub>) и центральных (T<sub>CM</sub>) клеток памяти от общего числа CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в легких и селезенке через 21 день после однократной иммунизации Flu/ESAT-6\_Ag85A мышей C57/black/6**

Table 1. The percentage of effector (T<sub>EM</sub>) and central memory (T<sub>CM</sub>) cells of the total number of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes in the lungs and spleen 21 days after a single immunization of C57/black/6 mice with Flu/ESAT-6\_Ag85A

Группы Groups	CD4 <sup>+</sup>		CD8 <sup>+</sup>	
	T <sub>EM</sub> (%)	T <sub>CM</sub> (%)	T <sub>EM</sub> (%)	T <sub>CM</sub> (%)
<b>Легкие/Lungs</b>				
Плацебо/Placebo	40,25±4,84	2,99±0,23	27,88±4,99	12,84±2,86
Flu/ESAT-6_Ag85A	41,5±6,72	4,31±0,41 p < 0,0001*	41,41±5,49 p < 0,001* p < 0,0001**	11,48±1,72
БЦЖ/BCG	37,95±2,11	4,67±1,37 p < 0,01*	26,54±2,36	11,31±3,90
<b>Селезенка/Spleen</b>				
Плацебо/Placebo	29,67±4,32	4,53±1,24	20,74±6,05	17,88±3,60
Flu/ESAT-6_Ag85A	29,01±1,09	6,66±1,01 p < 0,008*	19,76±3,06	19,55±1,53
		p < 0,01**		
БЦЖ/BCG	31,81±4,17	4,95±0,96	17,58±7,87	17,00±5,75

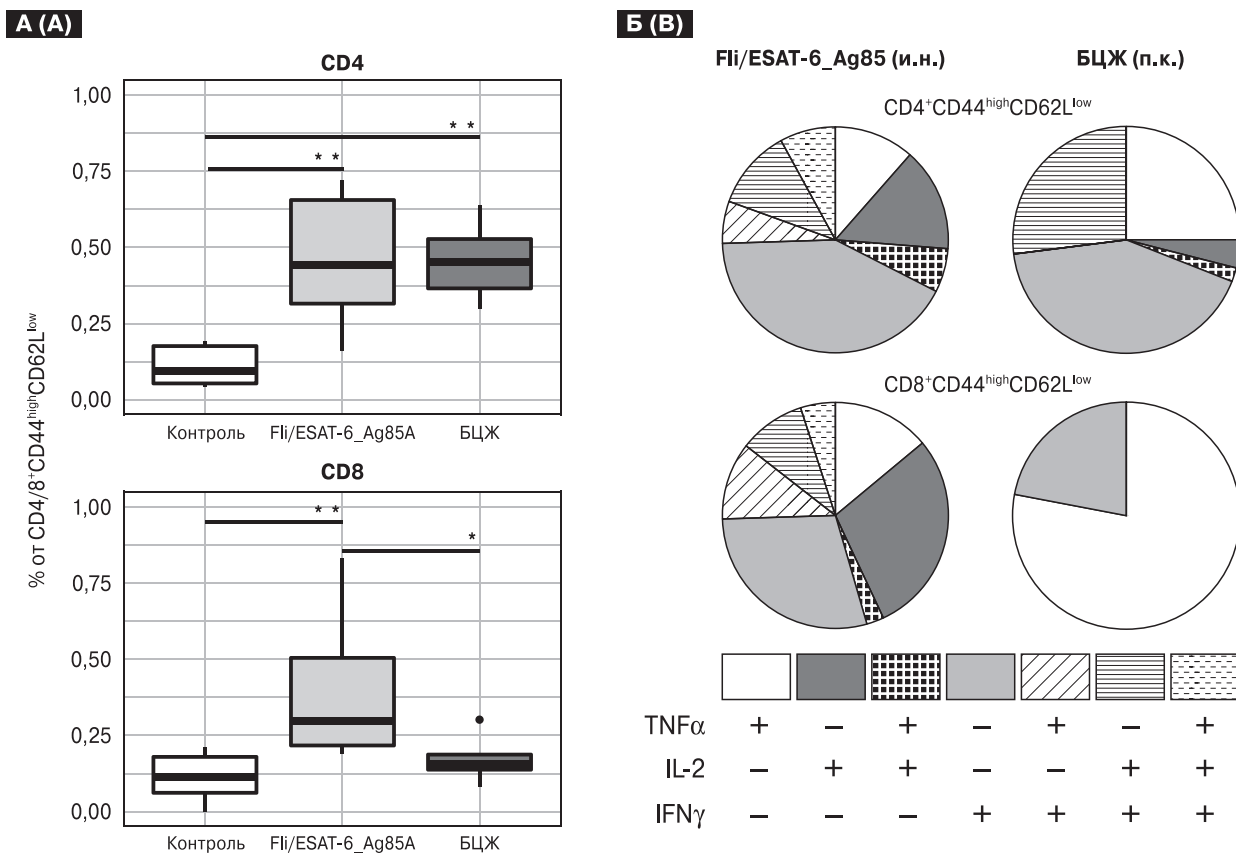
**Примечание:** \* — различия достоверны при сравнении с контролем (плацебо); \*\* — различия достоверны при сравнении с группой БЦЖ.  
Note: \* — differences are significant in comparison with control (placebo); \*\* — differences are significant in comparison with BCG group.

на, обнаружено не было, все T<sub>EM</sub> клетки продуцировали либо IFN $\gamma$ , либо TNF $\alpha$ .

Иммунизация Flu/ESAT-6\_Ag85A привела к повышению суммарного процентного содержания цитокин-продуцирующих антиген-специфических CD8<sup>+</sup> клеток памяти легких с фенотипом CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>low</sup> (рис. 2А) и к расширению спектра цитокин-продуцирующих CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> клеток. У вакцинированных Flu/ESAT-6\_Ag85A мышей отмечалось увеличение числа CD4<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> клеток памяти, секретирующих IL-2, и полифункциональных клеток, секретирующие 2 и 3 цитокина (IFN $\gamma$ , IL-2 и TNF $\alpha$ , рис. 2Б). В структуре CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> клеток обнаружено появление T<sub>EM</sub> клеток памяти — продуцентов IL-2, а также полифункциональных двойных и тройных антигенспецифических T<sub>EM</sub> продуцентов.

*Характеристики специфических CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> эффекторных Т-клеток памяти, образующихся при «буст»-вакцинации гриппозным вектором БЦЖ-праймированных мышей.* При «буст»-вакцинации Flu/ESAT-6\_Ag85A мышей, предварительно (за 4 месяца) праймированных БЦЖ, анализ субпопуляционного состава антиген-специфических цитокин-продуцирующих T<sub>EM</sub>-клеток памяти в структуре CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов легких, проводился через 4 недели после иммунизации гриппозным вектором.

Сравнение субпопуляций антигенспецифических эффекторных клеток памяти легких группы «буст»-иммунизированных мышей и животных контрольной группы (вакцинированные только БЦЖ) показало расширение репертуара цитокин-продуцирующих CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> лимфоцитов у «прайм-буст» вак-



**Рисунок 2. Продукция IFN $\gamma$ , IL-2, TNF $\alpha$  эффекторными CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетками памяти легких мышей C57/black/6 через 21 день после однократной вакцинации Flu/ESAT-6\_Ag85A (интраназально) либо БЦЖ (подкожно) в ответ на стимуляцию белком Ag85A**

Figure 2. Production of IFN $\gamma$ , IL-2, TNF $\alpha$  by effector CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> memory T-cells from the lungs of C57/black/6 mice 21 days after a single vaccination with Flu/ESAT-6\_Ag85A (intranasal) or BCG (subcutaneous) in response to stimulation with Ag85A protein

**Примечание.** А) Суммарное процентное содержание цитокин-продуцирующих Ag85A-специфических CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> клеток легких. Б) Круговые диаграммы отражают относительное содержание различных цитокин-продуцирующих Ag85A-специфических популяций CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> клеток легких. \* — p < 0,05; \*\* — p < 0,005 непараметрический критерий Манна–Уитни.

Note. A) The percentage of the total cytokine-producing Ag85A-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> cells of the lungs. B) The relative content of different cytokine-producing populations of Ag85A-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> cells of the lungs is shown in the pie charts. \* — p < 0.05, \*\* — p < 0.005 (non-parametric Mann–Whitney test).

цинированных животных (табл. 2). Так, если в пуле эффекторных CD4<sup>+</sup> клеток памяти легких ходе первичного иммунного ответа к БЦЖ сформированы только продуценты TNFα, IFNγ и двойные продуценты IFNγ<sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup>, то у «буст»-вакцинированных Flu/ESAT-6\_Ag85A мышей кроме выше упомянутых популяций обнаружены клетки, секретирующие IL-2<sup>+</sup> (0,07%) и клетки — тройные продуценты IFNγ<sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup>TNFα<sup>+</sup> (0,05%). В популяции же CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> клеток памяти легких наряду с лимфоцитами, продуцирующими только TNFα или IFNγ, детектированы клетки, секретирующие IL-2 (0,11%), и полифункциональные клетки — двойные продуценты IFNγ<sup>+</sup>TNFα<sup>+</sup> (0,05%).

Отразилась «буст»-иммунизация Flu/ESAT-6\_Ag85A и на суммарном процентном содержании цитокин-продуцирующих антигенспецифических CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> клеток памяти легких, повысив его более чем в 2 раза (с 0,18% у вакцинированных только БЦЖ до 0,38% в группе «буст»-вакцинированных гриппозным вектором).

### Обсуждение

Неспособность вакцины БЦЖ обеспечить долгосрочный протективный иммунитет и недостаточная неэффективность в защите от основной формы туберкулезной инфекции — легочного туберкулеза — определяет необходимость исследований иммунологических механизмов эффективного поствакцинального ответа [7, 12]. Одним из решающих факторов

выбора эффективного вакцинного кандидата является способность противотуберкулезной вакцины влиять на генерацию, жизнеспособность и функциональную активность Т-клеток памяти, поскольку в основе всех действующих методов вакцинации лежит феномен генерации «центральных» Т-клеток памяти (T<sub>CM</sub>), определяющих долговременные эффекты вакцинации. Поэтому поиск противотуберкулезных вакцинных препаратов, способных стимулировать образование долгоживущих и функционально активных Т-лимфоцитов с фенотипом клеток памяти, является одной из первостепенных задач фтизиатрии.

В данном исследовании однократная интраназальная иммунизация мышей C57/black/6 рекомбинантным гриппозным вектором Flu/ESAT-6\_Ag85A привела к значимому повышению содержания в пуле лимфоцитов селезенки антигенспецифических T<sub>CM</sub> (CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>high</sup>) клеток. Поскольку при этом у мышей, вакцинированных БЦЖ, существенного увеличения доли T<sub>CM</sub> спленоцитов не отмечено, данный эффект иммунизации Flu/ESAT-6\_Ag85A позволяет предположить о способности вакцины обеспечивать долгосрочный поствакцинальный иммунитет для адекватного иммунного ответа при повторной встрече организма с *M. tuberculosis*. В легких иммунизация Flu/ESAT-6\_Ag85A вызвала повышение содержания антигенспецифических CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> лимфоцитов, активность которых связывают с обеспечением контроля над реактивацией латентных очагов

**Таблица 2. Процент различных популяций Ag85A-специфических цитокин-продуцирующих эффекторных Т-клеток памяти (T<sub>EM</sub>) от общего числа CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов легких через 4 недели после «буст»-иммунизации Flu/ESAT-6\_Ag85A мышей C57/black/6 праймированных БЦЖ**

Table 2. The percentage of different populations of Ag85A-specific cytokine-producing effector (T<sub>EM</sub>) cells of the total number of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes in the lungs 4 weeks after a boost-immunization of BCG-primed C57/black/6 mice with Flu/ESAT-6\_Ag85A

Цитокинпродуцирующие клетки (%) Cytokine-producing cells	CD4 <sup>+</sup> CD44 <sup>high</sup> CD62L <sup>low</sup> (%)		CD8 <sup>+</sup> CD44 <sup>high</sup> CD62L <sup>low</sup> (%)	
	БЦЖ BCG	БЦЖ → FLU/ ESAT-6_Ag85A BCG → FLU/ ESAT-6_Ag85A	БЦЖ BCG	БЦЖ → FLU/ ESAT-6_Ag85A BCG → FLU/ ESAT-6_Ag85A
IFNγ <sup>-</sup> IL-2-TNFα <sup>+</sup>	0,13	0,15	0,14	0,11
IFNγ <sup>-</sup> IL-2 <sup>+</sup> TNFα <sup>-</sup>	0,02	0,07	0,00	0,11
IFNγ <sup>-</sup> IL-2 <sup>+</sup> TNFα <sup>+</sup>	0,01	0,02	0,00	0,04
IFNγ <sup>+</sup> IL-2-TNFα <sup>-</sup>	0,22	0,18	0,06	0,05
IFNγ <sup>+</sup> IL-2-TNFα <sup>+</sup>	0,00	0,01	0,00	0,05
IFNγ <sup>+</sup> IL-2 <sup>+</sup> TNFα <sup>-</sup>	0,14	0,06	0,00	0,01
IFNγ <sup>+</sup> IL-2 <sup>+</sup> TNFα <sup>+</sup>	0,00	0,05	0,00	0,02
<b>Общее количество</b> Total number	0,51	0,54	0,18	0,38
	TNFα <sup>+</sup> (0,13%) IFNγ <sup>+</sup> (0,22%) IFNγ <sup>+</sup> IL-2 <sup>+</sup> (0,14%)	TNFα <sup>+</sup> (0,15%) IFNγ (0,18%) IL-2 <sup>+</sup> (0,07%) IFNγ <sup>+</sup> IL-2 <sup>+</sup> (0,06%) IFNγ <sup>+</sup> IL-2 <sup>+</sup> TNFα <sup>+</sup> (0,05%)	TNFα (0,14%) IFNγ (0,06%)	TNFα (0,11%) IL-2 (0,11%) IFNγ (0,05%) IFNγ <sup>+</sup> TNFα <sup>+</sup> (0,05%)

эндогенной инфекции, а неспособность БЦЖ индуцировать продукцию  $CD8^+$  Т-клеток считается одним из важнейших ее недостатков [3, 16]. Вероятнее всего этот эффект Flu/ESAT-6\_Ag85A обусловлен интраназальным способом введения вектора, ориентированным на формирование иммунного ответа на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей, поскольку известно, что при применении мукозальных вакцин образуются ассоциированные с тканью эффекторные  $CD8^+$  Т-клетки памяти [4, 14].

Иммунизация Flu/ESAT-6\_Ag85A, индуцирующая по представленным данным формирование выраженного антигенспецифического  $CD4^+CD8^+$  Th1 ответа  $T_{EM}$  лимфоцитов легких, в сравнении с БЦЖ привела к увеличению числа цитокин-продуцирующих антигенспецифических  $CD8^+$   $T_{EM}$  клеток памяти, к повышению содержания  $T_{EM}$  клеток — продуцентов IL-2 и полифункциональных  $CD4^+$  и  $CD8^+$   $T_{EM}$  клеток, продуцирующих IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  и IL-2, появление которых тесно связано с протективным характером поствакцинального иммунного ответа [5, 8].

Способность Flu/ESAT-6\_Ag85A генерировать образование полифункциональных антигенспецифических  $CD4^+$  и  $CD8^+$   $T_{EM}$  клеток памяти подтверждена и при включении вектора в схему гетерологичной вакцинации («прайм-буст» стратегия), считающейся на настоящий момент наиболее перспективным путем повышения длительности протекции. При этом Flu/ESAT-6\_Ag85A при «буст»-иммунизации мышшей, праймированных БЦЖ, как и в стандартной схеме вакцинации, обеспечила повышение суммарного процента содержания антигенспецифических цитокин-продуцирующих  $CD8^+$   $T_{EM}$  клеток памяти легких, индуцировала образование  $CD4^+$  и  $CD8^+$   $T_{EM}$  клеток памяти, секретирующих IL-2, и полифункциональных  $T_{EM}$  клеток. Эти результаты подтверждают перспективность включения Flu/ESAT-6\_Ag85A в схему «прайм-буст» вакцинации, поскольку по данным литературы эффективное бустирование с повышением протективного эффекта вакцинации всегда сопровождается усилением Th1 ответа клеточного ответа, ответа цитотоксичес-

ких  $CD8^+$  клеток [6, 18] и увеличением числа полифункциональных  $CD4^+$  Т-клеток [13, 18]. В некоторых работах при этом подчеркивается значимость повышения вакцинными кандидатами доли  $CD4^+$  Т-клеток, продуцирующих IL-2 клеток [13], поскольку их считают маркером функционального истощения Т-клеток [2, 10].

Выявленные особенности антигенспецифического ответа  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-клеток памяти на иммунизацию Flu/ESAT-6\_Ag85A в стандартной и в «прайм-буст» схемах вакцинации дополняют предыдущие исследования по протективному и иммунотропному эффекту вакцины при экспериментальном туберкулезе [1] и могут способствовать выбору иммунологических маркеров эффективного иммунитета при исследовании вакцинных кандидатов.

## Заключение

Интраназальная вакцинация мышшей C57/black/6 векторной вакциной Flu/ESAT-6\_Ag85A при сравнении с эффектом БЦЖ сопровождается:

- увеличением доли антигенспецифических центральных  $CD4^+$  Т-клеток памяти в пуле активированных лимфоцитов легких и селезенки иммунизированных мышшей, достигшей статистически значимой разницы с группой БЦЖ по процентному содержанию  $CD4^+$   $T_{CM}$  селезенки ( $p < 0,01$ );
- аккумуляцией высококодифференцированных  $CD8$  клеток-эффекторов в органе-мишени туберкулезной инфекции — легких;
- формированием функционально активных субпопуляций антигенспецифических эффекторных  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-клеток памяти ( $CD44^{hi}CD62L^{lo}$ ), секретирующих IL-2 и полифункциональных клеток, способных к выработке двух (IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$ ; IFN $\gamma$  и IL-2) и трех (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  и IL-2) цитокинов.

«Буст»-вакцинация Flu/ESAT-6\_Ag85A мышшей C57Black/6, праймированных БЦЖ, также привела к генерации антигенспецифических IL-2-продуцирующих  $CD4^+$  и  $CD8^+$   $T_{EM}$  лимфоцитов и к появлению полифункциональных  $CD4^+$  и  $CD8^+$   $T_{EM}$  клеток памяти.

## Список литературы/References

1. Заболотных Н.В., Шурыгина А.-П.С., Виноградова Т.И., Витовская М.Л., Хайруллин Б.М., Сандыбаев Н.Т., Бузицкая Ж.В., Стукова М.А. Усиление протективного эффекта вакцины БЦЖ при мукозальной буст-иммунизации гриппозным вектором, экспрессирующим микобактериальные белки ESAT-6 и Ag85A // Биофармацевтический журнал. 2016. Т. 8, № 6. С. 25–31. [Zabolotnykh N.V., Vinogradova T.I., Shurygina A.-P.S., Khairullin B.M., Sandybaev N.T., Buzitskaya Zh.V., Stukova M.A. Mucosal immunization with influenza vector expressing ESAT-6 and Ag85A antigens of M. tuberculosis enhances protective effect of BCG vaccine. *Biopharmaceuticheskiy zhurnal = Journal of Biopharmaceuticals*, 2016, vol. 8, no. 6, pp. 25–31. (In Russ.)]
2. Bai C., He J., Niu H., Hu L., Luo Y., Liu X., Peng L., Zhu B. Prolonged intervals during Mycobacterium tuberculosis subunit vaccine boosting contributes to eliciting immunity mediated by central memory-like T cells. *Tuberculosis*, 2018, vol. 110, pp. 104–111. doi: 10.1016/j.tube.2018.04.006C
3. Behar S.M. Antigen-specific  $CD8^+$  T cells and protective immunity to tuberculosis. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2013, vol. 783, pp. 141–163. doi: 10.1007/978-1-4614-6111-1\_8



4. Beverley P.C., Sridhar S., Lalvani A., Tchilian E.Z. Harnessing local and systemic immunity for vaccines against tuberculosis. *Mucosal Immunol.*, 2014, vol. 7, no. 1, pp. 20–26. doi: 10.1038/mi.2013.99
5. Cha S.B., Kim W.S., Kim J.S., Kim H.M., Kwon K.W., Han S.J., Cho S.N., Coler R.N., Reed S.G., Shin S.J. Pulmonary immunity and durable protection induced by the ID93/GLA-SE vaccine candidate against the hyper-virulent Korean Beijing Mycobacterium tuberculosis strain K. *Vaccine*, 2016, vol. 34, no. 19, pp. 2179–2187. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.03.029
6. Ding Y., Zheng H., Feng C., Wang B., Liu C., Mi K., Cao H., Meng S. Heat-shock protein gp96 enhances T cell responses and protective potential to bacillus Calmette–Guérin vaccine. *Scand. J. Immunol.* 2016, vol. 84, no. 4, pp. 222–228. doi: 10.1111/sji.12463
7. Kaveh D.A., Garcia-Pelayo M.C., Hogarth P.J. Persistent BCG bacilli perpetuate CD4 T effector memory and optimal protection against tuberculosis. *Vaccine*, 2014, vol. 32, pp. 6911–6918. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.10.041
8. Kim W.S., Kim J.S., Kim H.M., Kwon K.W., Eum S.Y., Shin S.J. Comparison of immunogenicity and vaccine efficacy between heat-shock proteins, HSP70 and GrpE, in the DnaK operon of Mycobacterium tuberculosis. *Sci. Rep.*, 2018, vol. 8, no. 1: 14411.
9. Liang J., Teng X., Yuan X., Zhang Y., Shi C., Yue T., Zhou L., Li J., Fan X. Enhanced and durable protective immune responses induced by a cocktail of recombinant BCG strains expressing antigens of multistage of Mycobacterium tuberculosis. *Mol. Immunol.*, 2015, vol. 66, no. 2, pp. 392–401. doi: 10.1016/j.molimm.2015.04.017
10. Lindstrom T., Knudsen N.P., Agger E.M., Andersen P. Control of chronic Mycobacterium tuberculosis infection by CD4 KLRG1-, IL-2-secreting central memory cells. *J. Immunol.*, 2013, vol. 190, pp. 6311–6319. doi: 10.4049/jimmunol.1300248
11. Ma J., Tian M., Fan X., Yu Q., Jing Y., Wang W., Li L., Zhou Z. Mycobacterium tuberculosis multistage antigens confer comprehensive protection against pre- and post-exposure infections by driving Th1-type T cell immunity. *Oncotarget*, 2016, vol. 7, no. 39, pp. 63804–63815. doi: 10.18632/oncotarget.11542
12. Moliva J.I., Turner J., Torrelles J.B. Immune responses to bacillus Calmette–Guérin vaccination: why do they fail to protect against Mycobacterium tuberculosis? *Front. Immunol.*, 2017, vol. 8: 407. doi: 10.3389/fimmu.2017.00407
13. Nandakumar S., Kannanganat S., Dobos K.M., Lucas M., Spencer J.S., Amara R.R., Plikaytis B.B., Posey J.E., Sable S.B. Boosting BCG-primed responses with a subunit Apa vaccine during the waning phase improves immunity and imparts protection against Mycobacterium tuberculosis. *Sci. Rep.*, 2016, vol. 6: 25837. doi: 10.1038/srep25837
14. Perdomo C., Zedler U., Kühl A.A., Lozza L., Saikali P., Sander L.E., Vogelzang A., Kaufmann S.H., Kupz A. Mucosal BCG vaccination induces protective lung-resident memory T cell populations against tuberculosis. *MBio*, 2016, vol. 7, no. 6: e.01686. doi: 10.1128/mBio.01686-16
15. Romanova J., Krenn B.M., Wolschek M., Ferko B., Romanovskaja-Romanko E., Morokutti A., Shurygina A.P., Nakowitsch S., Ruthsatz T., Kiefmann B., König U., Bergmann M., Sachet M., Balasingam S., Mann A., Oxford J., Slais M., Kiselev O., Muster T., Egorov A. Preclinical evaluation of a replication-deficient intranasal DeltaNS1 H5N1 influenza vaccine. *PLoS One*, 2009, vol. 4, no. 6: e.5984. doi: 10.1371/journal.pone.0005984
16. Ryan A.A., Nambiar J.K., Wozniak T.M., Roediger B., Shklovskaya E., Britton W.J., Fazekas de St Groth B., Triccas J.A. Antigen load governs the differential priming of CD8 T cells in response to the bacille Calmette Guerin vaccine or Mycobacterium tuberculosis infection. *J. Immunol.*, 2009, vol. 182, no. 11, pp. 7172–7177. doi: 10.4049/jimmunol.0801694
17. Xu Y., Yang E., Wang J., Li R., Li G., Liu G., Song N., Huang Q., Kong C., Wang H. Prime-boost bacillus Calmette–Guérin vaccination with lentivirus-vectored and DNA-based vaccines expressing antigens Ag85B and Rv3425 improves protective efficacy against Mycobacterium tuberculosis in mice. *Immunology*, 2014, vol. 143, no. 2, pp. 277–286. doi: 10.1111/imm.12308
18. Zhang M., Dong C., Xiong S. Heterologous boosting with recombinant VSV-846 in BCG-primed mice confers improved protection against Mycobacterium infection. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2017, vol. 13, no. 4, pp. 816–822. doi: 10.1080/21645515.2016.1261229

**Авторы:**

**Шурыгина А.-П.С.**, к.м.н., старший научный сотрудник, лаборатория векторных вакцин ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия;

**Заболотных Н.В.**, д.м.н., ведущий научный сотрудник направления «Экспериментальный туберкулез и инновационные технологии» ФГБУ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия;

**Виноградова Т.И.**, д.м.н., главный научный сотрудник, координатор направления «Экспериментальный туберкулез и инновационные технологии» ФГБУ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия;

**Васильев К.А.**, научный сотрудник лаборатории векторных вакцин ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия;

**Бузицкая Ж.В.**, к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории векторных вакцин ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия;

**Стукова М.А.**, к.м.н., зав. лабораторией векторных вакцин НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия.

**Authors:**

**Schurygina A.-P.S.**, PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Vectored Vaccine, Smorodintsev Research Institute of Influenza Russian Ministry of Health, St. Petersburg, Russian Federation;

**Zabolotnykh N.V.**, PhD, MD (Medicine), Leading Researcher of the “Experimental Tuberculosis and Innovative Technologies” Direction, St. Petersburg State Research Institute of Phthisiopulmonology Russian Ministry of Health, St. Petersburg, Russian Federation;

**Vinogradova T.I.**, PhD, MD (Medicine), Head Researcher of the “Experimental Tuberculosis and Innovative Technologies” Direction, St. Petersburg State Research Institute of Phthisiopulmonology Russian Ministry of Health, St. Petersburg, Russian Federation;

**Vasiliev K.A.**, Researcher, Laboratory of Vectored Vaccine, Smorodintsev Research Institute of Influenza Russian Ministry of Health, St. Petersburg, Russian Federation;

**Buzitskaya Zh.V.**, PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Vectored Vaccine, Smorodintsev Research Institute of Influenza Russian Ministry of Health, St. Petersburg, Russian Federation;

**Stukova M.A.**, PhD (Medicine), Head of the Laboratory of Vectored Vaccine, Smorodintsev Research Institute of Influenza Russian Ministry of Health, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 21.06.2019  
Отправлена на доработку 13.12.2019  
Принята к печати 11.03.2020

Received 21.06.2019  
Revision received 13.12.2019  
Accepted 11.03.2020