Российский иммунологический журнал 2021, Т. 24, № 1, стр. 123-132 © 2021, РНОИ

Оригинальные статьи
Original articles

Russian Journal of Immunology / Rossiyskiy Immunologicheskiy Zhurnal 2021, Vol. 24, № 1, pp. 123-132 © 2021, RSI

ВЛИЯНИЕ ПРОТИВОЧУМНОЙ ВАКЦИНАЦИИ НА ФАГОЦИТАРНУЮ АКТИВНОСТЬ ГРАНУЛОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Кравцов А.Л., Клюева С.Н., Кожевников В.А., Кудрявцева О.М., Бугоркова С.А.

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт "Микроб"», г. Саратов, Россия

Резюме. Противочумная вакцинация стимулирует фагоцитоз клеток *Yersinia pestis* лейкоцитами крови лабораторных животных, но ее влияние на фагоцитарную активность лейкоцитов человека по отношению к чумному микробу не изучалось. В настоящей работе с помощью проточной цитометрии исследовали фагоцитарную активность гранулоцитов крови привитых и не привитых против чумы людей, проживающих на территории природного очага чумы Российской Федерации, по отношению к *Y. pestis*, *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*. Результаты фагоцитарной реакции учитывали в микрообъемах цельной крови. Иммуноферментным методом оценивали индуцированную продукцию лейкоцитами крови IFNγ, а также определяли в сыворотках крови титры специфических антител к капсульному антигену (F1) чумного микроба. Установлено, что у ранее не прививавшихся против чумы людей фагоцитарная активность гранулоцитов крови по отношению к *Y. pestis* в 3 раза ниже, чем у лиц, неоднократно привитых вакциной чумной живой, и в 5 раз ниже, чем в опытах с клетками *E. coli* и *S. aureus*. Ежегодная вакцинация стимулирует поглотительную способность фагоцитов крови по отношению к чумному микробу *in vitro*. Индивидуальные значения фагоцитарных индексов имели прямую корреляционную связь с титрами сывороточных антител ($r = 0,65$, $p = 0,0004$) и с уровнем продукции IFNγ ($r = 0,73$, $p = 0,0004$). Таким образом, полученные данные подтвердили зависимость фагоцитарной активности лейкоцитов крови человека от вида возбудителя и позволили доказать связь активации фагоцитарной реакции у привитых вакциной чумной живой лиц по отношению к клеткам *Y. pestis* с другими показателями (специфические антитела к F1, индуцированная продукция IFNγ) эффективности прививки. Дальнейшие исследования в этом направлении позволят приблизить разработку информативного теста оценки напряженности противочумного иммунитета.

Ключевые слова: Yersinia pestis, противочумная вакцинация, гранулоциты крови человека, фагоцитоз, проточная цитометрия

Адрес для переписки:
Клюева Светлана Николаевна
ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт "Микроб"»
410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, 46.
Тел.: 8 (987) 830-50-75.
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 (987) 830-50-75.
Fax: 7 (452) 51-52-12.
E-mail: klyueva.cvetlana@mail.ru

Образец цитирования:
А.Л. Кравцов, С.Н. Клюева, В.А. Кожевников, О.М. Кудрявцева, С.А. Бугоркова «Влияние противочумной вакцинации на фагоцитарную активность гранулоцитов крови человека» // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 1. С. 123-132. doi: 10.46235/1028-7221-166-EOA

© Кравцов А.Л. и соавт., 2021

For citation:
A.L. Kravtsov, S.N. Klyueva, V.A. Kozhevnikov, O.M. Kudryavtseva, S.A. Bugorkova "Effect of anti-plague vaccination on phagocytic activity of human blood granulocytes", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskiy Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 1, pp. 123-132. doi: 10.46235/1028-7221-166-EOA

DOI: 10.46235/1028-7221-166-EOA

EFFECT OF ANTI-PLAGUE VACCINATION ON PHAGOCYTIC ACTIVITY OF HUMAN BLOOD GRANULOCYTES

Kravtsov A.L., Klyueva S.N., Kozhevnikov V.A., Kudryavtseva O.M., Bugorkova S.A.

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Abstract. Anti-plague vaccination stimulates phagocytosis of *Yersinia pestis* cells by blood leukocytes of laboratory animals. However its effect on the phagocytic activity of human white blood cells towards plague microbes has not been studied. In this work, flow cytometry was used to study phagocytic activity of blood granulocytes towards *Y. pestis, Escherichia coli* and Staphylococcus aureus in the people vaccinated, or not vaccinated against plague. These persons inhabited the territories of natural plague foci in Russian Federation. The results of phagocytic activity were evaluated in microvolumes of whole blood. The induced IFNγ production was evaluated in blood by enzyme immunoassay technique, and the titers of specific antibodies to plague-specific F1 antigen were determined in blood serum samples. It was found, that the subjects who have never been vaccinated against plague had 3-fold lower granulocyte phagocytic activity towards *Y. pestis* than the persons repeatedly vaccinated with live plague vaccine, and 5-fold lower than phagocytosis of *E. coli* and *S. aureus*. The next annual revaccination caused additional stimulation of *in vitro* phagocytic capacity of blood leukocytes with respect to plague microbes. Individual values of phagocytic indices correlated with serum antibody titers ($r = 0.65$, $p = 0.0004$), and with levels of IFNγ production ($r = 0.73$, $p = 0.0004$). Thus, the obtained data confirmed dependence between phagocytic activity of human blood leukocytes and the pathogen type, thus allowing to demonstrate a connection between activated phagocytic response to *Y. pestis* cells in live plague-vaccinated individuals with other immune indexes of vaccine efficiency (specific antibodies to F1, induced IFNγ production). Further research in this direction will bring us closer to development of an informative test for assessing the intensity of antiplague immunity.

Keywords: Yersinia pestis, anti-plague vaccination, human blood granulocytes, phagocytosis, flow cytometry

Введение

Чума входит в перечень опасных инфекционных болезней, способных вызывать чрезвычайные ситуации межгосударственного значения. Даже единичные случаи заболевания людей чумой рассматриваются как основание для проведения профилактических мероприятий. В 2015 г. на фоне эпизоотии в Горно-Алтайском высокогорном очаге чумы был зарегистрирован случай заболевания чумой человека, привитого за 3 месяца до этого вакциной чумной живой (ВЧЖ) на основе штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ [1]. Данный факт свидетельствовал о недостаточной изученности факторов, определяющих способность ВЧЖ защищать людей от чумной инфекции, и способствовал активизации исследований по комплексной оценке показателей иммунного статуса у населения, прививаемого ВЧЖ на территориях природных очагов чумы Российской Федерации [2, 7].

Наряду с совершенствованием тест-систем для детекции сывороточных антител к специфическим антигенам *Y. pestis*, для сравнительной оценки индивидуальных клеточных показателей противочумного иммунитета у лиц, относящихся к группам риска по заражению чумой, в настоящее время внедряются современные методы цитометрического анализа, что создает основу для автоматизации и повышения эффективности цитологических исследований [8, 11, 12].

Клеточные механизмы бактерицидности играют решающую роль в защите организма от чумной инфекции. Моделирование бубонной чумы у мышей позволило установить, что на внутрикожное введение живых клеток *Y. pestis* первыми *in vivo* отвечают нейтрофильные гранулоциты, фагоцитарная активность (ФА) которых по отношению к чумному микробу существенно повышается в иммунном организме и в условиях *in vitro* под влиянием «вооружающих» фагоциты сывороточных факторов (специфических антител и продуцируемых лимфоцитами регуляторных цитокинов) [13, 14, 21, 24]. Недавно стимулирующий эффект противочумной вакцинации на ФА гранулоцитов крови мышей в отношении чумного микроба был подтвержден в наших исследованиях цитофлуориметрическим методом, позволяющим быстро и объективно оценивать *in vitro* показатели фагоцитарной реакции в 100

мкл цельной крови человека или животного без предварительного выделения из нее гранулоцитов и сыворотки [6, 16, 17, 22, 26].

О ФА гранулоцитов крови людей в отношении возбудителя чумы известно очень мало. Имеющиеся данные микроскопического анализа свидетельствуют, что после опсонизации нормальной сывороткой чумной микроб поглощается и обезвреживается нейтрофилами крови человека менее эффективно, чем клетки золотистого стафилококка [15, 25]. Однако фагоцитоз чумного микроба лейкоцитами крови привитых и не привитых против чумы людей в тесте *in vitro* не изучался с использованием возможностей современного объективного цитометрического анализа. Результаты оценки ФА клеток первой линии врожденной антибактериальной защиты, полученные в опытах с клетками *Y. pestis*, не сравнивались в образцах цельной крови человека с показателями фагоцитарной реакции, характерными для других микроорганизмов – *E. coli* и *S. aureus*.

Цель настоящей работы – с помощью проточной цитометрии провести сравнительную оценку ФА гранулоцитов цельной крови привитых и не привитых против чумы людей по отношению к *Y. pestis* и ряду условно-патогенных бактерий.

Материалы и методы

Штаммы, используемые в работе: *Y. pestis* EV НИИЭГ, *E. coli* 25922ATCC и *S. aureus* 209-P, полученные из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Культуру *Y. pestis* выращивали на агаре Хоттингера (pH 7,2) в течение 48 ч при температуре 28 °С. Суточные культуры *E. coli* и *S. aureus* выращивали на агаре Хоттингера (pH 7,2) при 37 °С. По стандарту мутности ОСО 42-28-59-85П готовили миллиардные взвеси бактерий в фосфатно-солевом буфере pH 7,4 с 0,15 М NaCl (ФСБ), которые инактивировали нагреванием в течение 80 мин при 60 °С [6]. Обеззараженные бактерии окрашивали ФИТЦ (Sigma, США) и готовили миллиардные взвеси ФИТЦ-меченных клеток *Y. pestis, E. coli* и *S. aureus* в ФСБ с 5 мМ глюкозы и 0,1% желатина (ФСБг), которые разливали в микропробирки и хранили до использования в условиях морозильной камеры (-20±1) °С [17, 19, 22].

Исследовали образцы крови 45 человек, проживающих на территории Прикаспийского песчаного природного очага чумы. Среди них были лица, ранее не прививавшиеся ВЧЖ (группа I, n = 20), а также лица, неоднократно (от 2 до 30 раз) прививавшиеся ВЧЖ (группа II, n = 25). Для сравнения с группой I, результаты получали в группе II перед очередной ежегодной прививкой ВЧЖ производства ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора. Данные по оценке фагоцитоза в образцах крови каждого из обследуемых до очередной вакцинации сопоставляли с индивидуальными показателями через 1 и 6 месяцев после ее проведения.

От каждого добровольца, принявшего участие в исследовании, было получено письменное информированное согласие на забор клинического материала. Работа была одобрена этическим комитетом Саратовского государственного медицинского университета. Кровь для исследований забирали из локтевой вены в соответствии с ГОСТ Р 53079.4-2008 в пробирки Clot Activator VACUTEST с антикоагулянтом (гепарином). Полученные образцы крови использовали в течение 2-3 ч.

ФА гранулоцитов оценивали в отношении *Y. pestis, E. coli* и *S. aureus* по методу Hasui M. и соавт., разработанному для быстрого определения показателей фагоцитарной реакции в цельной крови человека [17]. Для этого 100 мкл крови разводили путем добавления 800 мкл ФСБг и смешивали со 100 мкл миллиардной взвеси исследуемого вида ФИТЦ-меченных бактерий; образцы инкубировали в темноте в течение 15 мин при 37 °С с перемешиванием в шейкере-инкубаторе ES20 (BioSan, Латвия). Фагоцитарную реакцию блокировали добавлением 2 мл ледяного раствора ФСБ с 3 mM ЭДТА в течение 2 мин, лейкоциты и эритроциты осаждали из раствора ЭДТА, препятствующего адгезии бактерий на поверхности клеток крови человека, центрифугированием (300 g, 5 мин). Осадок ресуспендировали на вортексе в 2 мл разведенного в 10 раз (согласно инструкции производителя) FACS Lysing Solution (BD Bioscience, США) для лизиса эритроцитов и фиксации клеток в течение 20 мин. Образцы лейкоцитов крови, фиксированных в FACS Lysing Solution, можно хранить в темноте до 3 суток при температуре 4 °С.

Процедуру гашения флуоресценции внеклеточных бактерий 0,2%-ным раствором трипанового синего не использовали, так как в опытах с фиксированными лейкоцитами крови она не эффективна и в сочетании с FACS Lysing Solution в последние годы в клинической практике не применяется [10, 16]. Современные лизирующие эритроциты реагенты фактически полностью удаляют бактерии с поверхности фиксированных формальдегидом лейкоцитов и для достоверной оценки методом проточной цитометрии поглотительной активности фагоцитов в микрообъемах цельной крови человека достаточно использования процедур центрифугирования лейкоцитов из растворов, препятствующих бактериальной адгезии: ЭДТА и лизирующего эритроциты реагента [10, 16, 17, 26].

Из FACS Lysing Solution лейкоциты осаждали непосредственно перед проведением цитофлуориметрического анализа, и осадок в каждой пробе ресуспендировали в 2 мл ФСБ с 3 mM ЭДТА. Полученные клеточные взвеси исследовали на лазерном проточном цитометре (DakoCytomation, Дания) с программным обеспечением Summit v. 4.3 Built 2445. Гранулоциты дифференцировали от лимфоцитов и моноцитов по показателям светорассеяния. В гейте гранулоцитов для каждого образца определяли фагоцитарный индекс (ФИ, %), среднее значение (Mean) фагоцитарного числа (ФЧ) в условных единицах интенсивности флуоресценции (каналах), а также коэффициент вариации (CV, %), отражающий степень неоднородности активных фагоцитов по ФЧ [6, 16, 17, 22, 26].

Антитела к капсульному антигену F1 *Y. pestis* определяли в сыворотках крови обследуемых лиц непрямым вариантом ИФА с помощью иммуноферментной тест-системы «ИФА-АТ-Ф1 YERSINIA PESTIS» (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Россия) в соответствии с инструкцией по применению на микропланшетном фотометре StatFax-3200 (AwarenessTechnology, США).

Продукцию лейкоцитами крови IFNγ, отражающую потенциальную способность клеток иммунной системы реагировать секрецией цитокинов на внешнюю стимуляцию, оценивали методом твердофазного иммуноферментного анализа на автоматическом иммуноферментном анализаторе LAZURIT (Dynex Technologies, США) при длине волны 450 нм. В качестве индуктора продукции цитокина использовали стандартный Т-клеточный митоген конканавалин А («ПанЭко», Россия) в концентрации 15 мкг/мл [6].

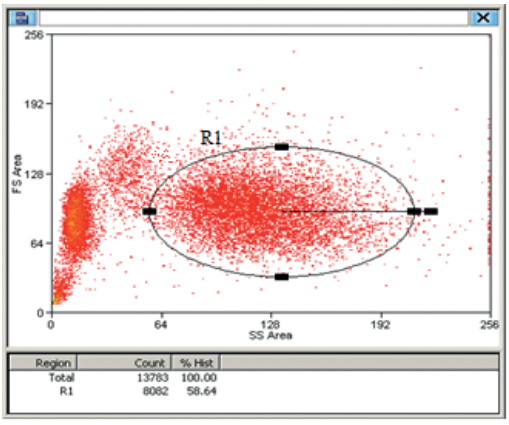

Рисунок 1. FS/SS Dot Plot образца цельной крови человека

Примечание. Показано распределение лейкоцитов крови по размеру (FS) и гранулярности (SS). Гранулоциты (58,64% лейкоцитов) регистрируются в области R1.

Figure 1. FS/SS Dot Plot human whole blood sample

Note. The distribution of blood leukocytes in size (FS) and granularity (SS) is shown. Granulocytes (58.64% of leukocytes) are recorded in the R1 region.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием стандартного пакета программ Microsoft Office Excel 2016. Взаимосвязь между исследуемыми параметрами определяли с помощью рангового корреляционного анализа по Спирмену. Корреляционные связи считали сильными при коэффициенте корреляции r = 0,7-1,0 и умеренной (средней) силы – при r = 0,3-0,7. Достоверность различий сравниваемых величин оценивали с помощью парного t-критерия Стьюдента. Результаты представляли в виде медианы (Me) и квартильных отклонений ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$).

Результаты

Результат идентификации гранулоцитов по клеточному объему и по степени внутриклеточной гранулярности с помощью одновременного измерения методом проточной цитометрии для каждого из лейкоцитов крови по показателям прямого (малоуглового, FS – Forward Scatter) и бокового (под углом 90°, SS – Side Scatter) светорассеяния представлен на цитграмме (рис. 1). Гранулоциты, обладающие самой высокой степенью внутриклеточной гранулярности, выделены по параметру SS в эллипсовидную область R1, где более 90% клеток – это нейтрофилы [10, 26]. Благодаря гейтированию по области R1, интенсивность флуоресценции активных фагоцитов регистрировали и оценивали для гранулоцитов без предварительного выделения этих клеток из образцов цельной крови человека.

Частотные распределения отдельных гранулоцитов по ФЧ, измеренным в опытах с *Y. pestis*, *E. coli* и *S. aureus* (рис. 2, гистограммы А, Б, В соответственно) наглядно иллюстрируют, что в крови лиц группы II перед очередной прививкой ВЧЖ фагоцитоз клеток *Y. pestis* был менее эффективен (ФИ = 40%, ФЧ = 822 у. е., CV = 140%), чем фагоцитоз клеток *E. coli* (ФИ = 96%, ФЧ = 1554 у. е., CV = 70%) и *S. aureus* (ФИ = 99%, ФЧ = 809 у. е., CV = 58%). Вакцинация в 2 раза повышала эффективность поглощения *Y. pestis* фагоцитами крови того же донора (рис. 2, гистограмма D).

До прививки ВЧЖ в образцах крови неоднократно вакцинированных против чумы людей (группа II) ФИ гранулоцитов в отношении *Y. pestis* были в 3 раза выше, чем в группе лиц, ранее не прививавшихся против чумы (группа I), и вдвое ниже значений ФИ в опытах с клетками *E. coli* и *S. aureus*. Под влиянием противочумной вакцинации снижалась степень различий в ФИ,

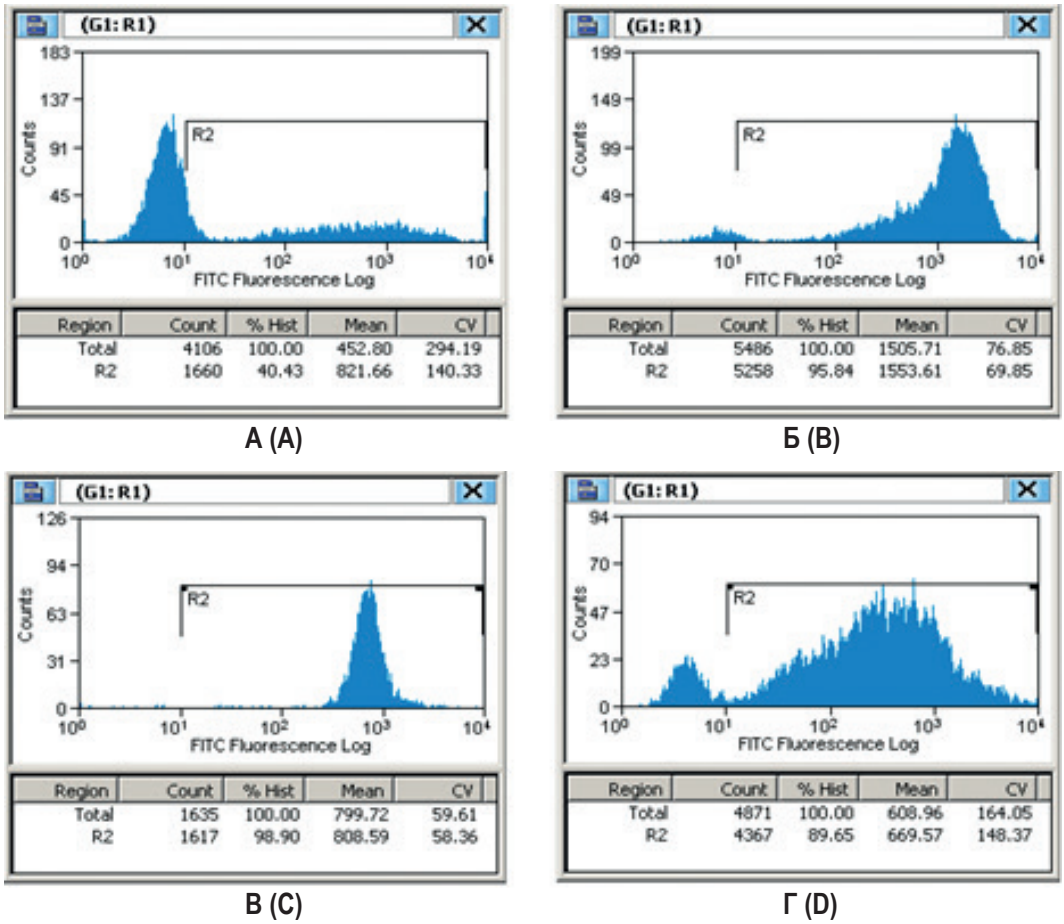

Рисунок 2. Результаты оценки фагоцитарной активности гранулоцитов крови одного из доноров группы II по отношению к *Y. pestis* (А), *E. coli* (Б) и *S. aureus* (В) до прививки ВЧЖ. Гистограмма Г иллюстрирует повышенную фагоцитарную активность гранулоцитов крови того же донора по отношению к *Y. pestis* через месяц после вакцинации

Примечание. Каждая гистограмма отражает распределение активных гранулоцитов по значениям ФЧ в условных единицах интенсивности ФИТЦ – флуоресценции (каналах). Активные фагоциты учитываются в области R2. Под каждой гистограммой для R2 приводятся соответствующие значения ФИ (% Hist), ФЧ (Mean, у. е.) и CV (%).

Figure 2. Results of the assessment of the phagocytic activity of blood granulocytes of one of the group II donors in relation to *Y. pestis* (A), *E. coli* (B) and *S. aureus* (C) before vaccination with HPV. Histogram D illustrates the increased phagocytic activity of blood granulocytes of the same donor in relation to *Y. pestis* one month after vaccination

Note. Each histogram reflects the distribution of active granulocytes by the values of PS in arbitrary units of the intensity of FITC – fluorescence (channels). Active phagocytes are counted in region R2. Under each histogram for R2, the corresponding values of FI (% Hist), PS (Mean, c. u.) and CV (%) are given.

регистрируемых в опытах с *Y. pestis* и условно-патогенными бактериями (табл. 1).

Кроме того, в сравнительных экспериментах с *Y. pestis* и условно-патогенными бактериями были выявлены достоверные различия в значениях ФЧ гранулоцитов крови. Так, ФЧ гранулоцитов крови в группе II перед очередной вакцинацией были в 5 раз меньше, чем в группе I. Фагоциты крови доноров из группы II поглощали на клетку в среднем в 6 раз больше клеток *Y. pestis*. Степень неоднородности их по ФЧ была в данной группе выше, чем в группе I (табл. 2). Все это регистрировали на фоне присутствия в крови подавляющего большинства доноров группы II специфических антител к капсульному антигену (F1) чумного микроба, а также на фоне повышенной продукции лейкоцитами крови регуляторного цитокина IFNγ (табл. 3).

Индивидуальные показатели фагоцитарной реакции и состояния «вооружающих» фагоциты факторов у доноров группы II до и после вакцинации представлены в таблице 4. Из этих данных следует, что у некоторых неоднократно привитых против чумы людей (например, у доноров № 8 и № 13, в отличие от № 12) гранулоциты крови еще перед очередной ежегодной прививкой ВЧЖ проявляли повышенную ФА в отношении клеток *Y. pestis* (ФИ > 60%). Очередная прививка ВЧЖ

ТАБЛИЦА 1. ФАГОЦИТАРНЫЕ ИНДЕКСЫ (ФИ) ГРАНУЛОЦИТОВ КРОВИ ПО ОТНОШЕНИЮ К *Y. PESTIS, E. COLI* И *S. AUREUS*, Me ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$)

TABLE 1. PHAGOCYTIC INDICES (PI) OF BLOOD GRANULOCYTES IN RELATION TO *Y. PESTIS, E. COLI* AND *S. AUREUS,* Me ($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)

Группа Group	**ФИ (%)** PI (%)		
	Y. pestis	***E. coli***	***S. aureus***
I	17,4 (14,5-48,9)**	99,3 (99,1-99,5)	99,2 (98,5-99,5)
II	51,1 (44,2-57,2)* **	96,7 (94,5-98,0)*	96,9 (95,5-97,6)*

Примечание. * – статистически значимые различия показателя в группах I и II; ** – статистические различия между *Y. pestis* и условно-патогенными бактериями.

Note. *, statistically significant differences of the indicator in groups I and II; **, statistical differences between *Y. pestis* and opportunistic bacteria.

ТАБЛИЦА 2. ФАГОЦИТАРНЫЕ ЧИСЛА (ФЧ) И КОЭФФИЦИЕНТЫ ВАРИАЦИИ ФЧ ГРАНУЛОЦИТОВ КРОВИ (CV) ПО ОТНОШЕНИЮ К *Y. PESTIS, E. COLI* И *S. AUREUS*, Me ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$)

TABLE 2. PHAGOCYTIC NUMBERS (PN) AND COEFFICIENT OF VARIATION OF PN OF BLOOD GRANULOCYTES (CV) WITH RESPECT TO *Y. PESTIS, E. COLI* AND *S. AUREUS,* Me ($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)

Группа Group	***Y. pestis***		***E. coli***		***S. aureus***	
	ФЧ (у. е.) PN (c. u.)	**CV (%)**	**ФЧ (у. е.),** PN (c. u.)	**CV (%)**	**ФЧ (у. е.)** PN (c. u.)	**CV (%)**
I	143 (99-150)**	90 (86-101)**	2515 (2304-2526)	47 (45-49)	1478 (1355-1608)	53 (50-60)
II	854 (606-946)* **	168 (152;185)** *	1618 (1477-1912)*	72 (54;86)*	1503 (1326;1644)	69 (65-74)*

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ТАБЛИЦА 3. ТИТРЫ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К F1 *Y. PESTIS* И МИТОГЕН-ИНДУЦИРОВАННАЯ ПРОДУКЦИЯ IFNγ, Me ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$)

TABLE 3. TITERS OF SPECIFIC ANTIBODIES TO F1 *Y. PESTIS* AND MITOGEN-INDUCED PRODUCTION OF IFNγ, Me ($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)

Группа Group	**Обратные титры антител к F1 *Y. pestis*** Reverse titers of antibodies to F1 *Y. pestis*	**Индуцированная продукция IFNγ (пг/мл)** Induced IFNγ production (pg/ml)
I	20 (0-40)	220 (148,4-309,2)
II	320 (160-320)*	341 (206,0-622,0)*

Примечание. * – статистически значимые различия показателей в группах I и II. Согласно инструкции к тест-системе диагностически значимые обратные титры антител должны быть ≥ 80.

Note. *, statistically significant differences in indicators in groups I and II. According to the instructions for the test system, the diagnostically significant reverse antibody titers should be ≥ 80.

активировала фагоцитарную функцию гранулоцитов крови в опытах *in vitro* с клетками *Y. pestis* у всех обследуемых. Однако степень этих изменений была различной. Через 1 и 6 месяцев после очередной прививки регистрировали дополнительное увеличение индивидуальных ФИ до значений равных и более 90%, соответственно, у 12% (3 из 25) и 44% (11 из 25) доноров.

В группе привитых против чумы людей по индивидуальным показателям выявлена сильная прямая корреляционная связь между ФИ гранулоцитов по отношению к *Y. pestis* и уровнем индуцируемой продукции в кровь IFNγ ($r = 0,73$; $p = 0,00004$), а также умеренная прямая корреляционная связь между ФИ и титрами специфических антител к F1 чумного микроба ($r = 0,59$; $p = 0,002$). Степень взаимосвязи этих показателей усиливалась после очередной прививки ВЧЖ ($r = 0,65$; $p = 0,0004$). Не установлено зависимо-

ТАБЛИЦА 4. ИНДИВИДУАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФАГОЦИТОЗА *Y. PESTIS* ДО И ПОСЛЕ РЕВАКЦИНАЦИИ ВЧЖ НА ФОНЕ РАЗЛИЧИЙ В ТИТРАХ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ И В УРОВНЕ ПРОДУКЦИИ ЛЕЙКОЦИТАМИ КРОВИ IFNγ

TABLE 4. INDIVIDUAL INDICATORS OF THE EFFECTIVENESS OF PHAGOCYTOSIS OF *Y. PESTIS* BEFORE AND AFTER REVACCINATION OF HPV AGAINST THE BACKGROUND OF DIFFERENCES IN THE TITERS OF SPECIFIC ANTIBODIES AND IN THE LEVEL OF PRODUCTION OF IFNγ BY WHITE BLOOD CELLS

N	K	Исследуемые показатели Research indicators											
		ФИ, % PI, %			ФЧ, у. е. PN, c. u.			ОТА RAT			IFNγ, пг/мл IFNγ, pg/ml		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
1	8	54	79	92	623	639	645	80	160	320	622	360	1526
2	9	40	90	97	822	670	791	160	320	160	334	900	1387
3	2	68	87	86	668	597	619	320	640	640	738	186	1080
4	10	58	77	86	743	574	628	320	160	320	708	1002	1552
5	10	52	80	93	593	343	788	160	160	160	341	414	1310
6	7	46	73	90	560	339	839	160	160	160	711	1062	1590
7	7	48	61	80	576	450	530	160	80	320	320	295	1172
8	16	74	87	94	854	537	658	320	80	160	607	187	936
9	19	56	56	93	568	417	542	160	160	320	544	595	1373
10	2	51	59	90	881	515	691	160	160	160	623	564	1498
11	3	37	55	78	919	386	676	80	80	80	206	1405	1675
12	8	29	54	66	560	430	628	40	40	80	75	125	656
13	2	66	93	90	985	615	1028	320	640	320	1186	1035	1290
14	30	46	90	74	963	572	911	640	320	640	137	226	419
15	15	51	87	81	1106	563	657	640	640	1280	286	348	467
16	16	53	86	97	851	643	1585	320	640	640	297	143	543
17	6	71	87	76	946	539	878	320	640	320	365	398	484
18	20	52	82	87	914	520	960	320	320	640	362	581	174
19	9	57	85	90	896	590	724	160	160	320	560	384	383
20	11	36	80	89	988	451	849	80	640	1280	61	129	162
21	20	39	72	70	1039	812	925	160	80	160	177	306	794
22	3	44	56	59	917	746	761	80	80	160	234	151	556
23	16	61	84	96	978	565	691	640	320	1280	330	402	1234
24	30	43	90	97	606	498	1300	160	1280	2560	250	569	763
25	2	49	65	80	836	500	980	320	320	320	517	892	1282

Примечание. N – номер обследуемого донора в группе II неоднократно привитых против чумы людей, К – количество прививок ВЧЖ, предшествовавших ревакцинации, проведенной в данной работе. А, В и С – значения показателей, полученные, соответственно, до ревакцинации, через 1 и 6 месяцев после ревакцинации. ОТА – обратные титры антител к F1 чумного микроба.

Note. N is the number of the examined donor in group II of people vaccinated against the plague several times; K is the number of vaccinations of the HPV prior to the revaccination carried out in this work. A, B and C are the values of the indicators obtained, respectively, before revaccination, 1 month and 6 months after revaccination. RAT, reverse titers of antibodies to F1 plague microbe.

сти показателей фагоцитарной реакции от количества предыдущих прививок ВЧЖ.

Обсуждение

Фагоцитоз является основой клеточного иммунитета при бактериальных инфекциях, и антибактериальное реагирование нейтрофильных гранулоцитов по данному показателю зависит, как известно, от вида возбудителя [4, 15, 18]. Данные, приведенные в настоящей работе, подтверждают эту зависимость и согласуются с результатами исследований с клетками крови лабораторных животных [6].

В свете современных представлений нейтрофил рассматривается как «многофункциональное устройство» иммунной системы, отвечающее на первичный контакт с инфекционным агентом многократным повышением экспрессии на клеточной поверхности рецепторов антител (Fc-R) и цитокинов, а также TLR, ответственных за прямое распознавание бактериальных липополисахаридов и некоторых других молекулярных структур патогенных микроорганизмов [3].

Переход нейтрофильных гранулоцитов в состояние «готовности» к более быстрому и интенсивному функциональному ответу на повторный контакт с инфекционным агентом называют «праймингом» или «иммунной памятью» на уровне рецепторов клеток врожденного иммунитета [9, 23].

В наших исследованиях повышенную ФА гранулоцитов крови привитых против чумы людей по отношению к клеткам *Y. pestis* можно объяснить как появлением в крови активирующих фагоцитоз специфических антител, так и «иммунной памятью» клеток врожденного иммунитета, от которой зависит интенсивность антигенспецифического клеточного ответа на повторное введение ВЧЖ [5]. Выявленная в работе прямая корреляционная связь между ФА гранулоцитов крови и уровнем продукции клетками крови IFNγ может отражать способность этого цитокина повышать экспрессию на поверхности активированных нейтрофилов Fc-рецепторов, являющихся триггерами иммунного фагоцитоза [9, 23].

При отсутствии в организме специфических антител к капсульному антигену F1 чумного микроба гранулоциты крови проявляли по отношению к клеткам *Y. pestis* сравнительно низкую ФА, которая повышалась после противочумной вакцинации. Умеренная прямая корреляционная связь между индивидуальными ФИ и титрами специфических антител к F1 *Y. pestis* в группе неоднократно привитых против чумы людей указывает на то, что опсонинами, стимулирующими ФА гранулоцитов крови иммунного организма по отношению к возбудителю чумы, могут быть антитела не только к капсульному антигену F1. Кроме антител к капсульному антигену F1 в крови привитых против чумы людей до 18 месяцев после прививки присутствуют, как известно, антитела к липополисахариду, основному соматическому антигену и пестину ПП [11].

Применение современной проточно-цитометрической технологии, не требующей выделения отдельных клеток и фракций из цельной крови, позволяет учитывать интегральный эффект всех возможных «вооружающих» фагоциты факторов (антител, комплемента, цитокинов, хемокинов и др.), повышает производительность сравнительного анализа индивидуальных показателей ФА до и после вакцинации, а также увеличивает степень стандартизации процедуры оценки показателей фагоцитарной реакции в тестах *in vitro* [16, 26].

Информация, полученная нами методом проточной цитометрии в опытах с клетками *Y. pestis,* согласуется с результатами исследований таких устойчивых к фагоцитозу возбудителей бактериальных инфекций, как *Neisseria meningitidis* и *Streptococcus pneumonia*e. Это особенно интересно, поскольку в настоящее время в зарубежных работах на основании характеристики показателя ФА, определяемого с помощью цитометрии в опытах *in vitro* с *N. meningitides* и *S. pneumoniae,* оценивают при клинических испытаниях иммунологическую эффективность менингококковых и пневмококковых вакцин [19, 20]. Аналогичный подход, по-видимому, можно предложить и для оценки у людей поствакцинального клеточного противочумного иммунитета.

Таким образом, полученные данные подтвердили зависимость ФА лейкоцитов крови человека от вида возбудителя и позволили доказать связь активации фагоцитарной реакции у привитых ВЧЖ лиц по отношению к клеткам *Y. pestis* с другими показателями (специфические антитела к F1, индуцированная продукция IFNγ) эффективности прививки. Дальнейшие исследования в этом направлении позволят приблизить разработку информативного теста оценки напряженности противочумного иммунитета.

Список литературы / References

1. Балахонов 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 эпилоотологические аспекты // Проблемы особо опасных инфекций, 2016, № 1. С. 55-60. [Balakhonov S.V., Popova A.Yu., Mishchenko A.I., Mikhailov E.P., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Denisov A.V., Rozhdestvensky 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. Бугоркова С.А., Щуковская Т.Н., Микшис Н.И., Клюева С.Н., Кудрявцева О.М., Кравцов А.Л., Гончарова А.Ю., Кожевников В.А., Санджиев Д.Н., Конушева С.В., Савченко С.П., Бембеева Е.С., Щербакова С.А.. Кутырев В.В. Комплексное иммунологическое исследование вакцинированных живой чумной вакциной лиц, проживающих на территории Прикаспийского песчаного очага чумы в Республике Калмыкия // Эпидемиология и вакцинопрофилактика, 2018. Т. 17, № 3. С. 38-49. [Bugorkova S.A., Shchukovskaya T.N., Mikshis N.I., Klyueva S.N., Kudryavtseva O.M., Kravtsov A.L., Goncharova A.Yu., Kozhevnikov V.A., Sandzhiev D.N., Konusheva S.V., Savchenko S.P., Bembeeva E.S., Shcherbakova S.A., Kutyrev V.V. Comprehensive immunological study of persons vaccinated with live plague vaccine living on the territory of the pre-Caspian sand foci of the plague in the republic of Kalmykia. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Preventation, 2018, Vol. 17, no. 3, pp. 38-50*. (In Russ.)]

3. Долгушин И.И., Мезенцева Е.А., Савочкина А.Ю., Кузнецова Е.К. Нейтрофил как «многофункциональное устройство» иммунной системы // Инфекция и иммунитет, 2019. Т. 9, № 1. С. 9-38. [Dolgushin I.I., Mezentseva E.A., Savochkina A.Yu., Kuznetsova E.K. Neutrophil as a multifunctional relay in immune system. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2019, Vol. 9, no. 1, pp. 9-38*. (In Russ.)]

4. Исачкова Л.М., Плехова Н.Г. К развитию представлений об антиинфекционной резистентности // Эпидемиология и инфекционные болезни, 2002. № 1. С. 11-15. [Isachkova L.M., Plekhova N.G. To develop the notion of anti-infection resistance. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases, 2002, no. 1, pp. 11-15*. (In Russ.)]

5. Каральник Б.В., Дерябин П.Н., Денисова Т.Г., Пономарева Т.С., Жунусова Г.Б., Закарян С.Б., Мухамедьярова Р.Б. Выявление иммунной памяти на первом этапе антигенспецифического клеточного ответа при повторном введении живой чумной вакцины // Эпидемиология и вакцинопрофилактика, 2019. Т. 18, № 6. С. 26-33. [Karalnik B.V., Deryabin P.N., Denisova T.G., Ponomareva T.S., Zunussova G.B., Zakaryan S.B., Vuchamedyarova R.B. Revelation of immune memory at the first stage of antigen-specific cell response after second introduction of the live plague vaccine. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Preventation, 2019, Vol. 18, no. 6, pp. 26-33*. (In Russ.)]

6. Клюева С.Н., Кравцов А.Л., Бугоркова С.А., Щуковская Т.Н., Кожевников В.А., Гончарова А.Ю. Фагоцитарная и цитокин-продуцирующая активность лейкоцитов крови мышей линии BALB/c, привитых против чумы на фоне иммуномодуляции полиоксидонием // Российский иммунологический журнал, 2019. Т. 13 (22), № 4. С. 1412-1420. [Klyueva S.N., Kravtsov A.L., Bugorcova S.N., Schukovskaya T.N., Kozhevnikov V.A., Goncharova A.Yu. Blood leukocyte phagocytic and cytokine producing activity of anti-plague vaccinated BALB/c mice against the background of immunomodulation by polyoxidonium. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology, 2019, Vol. 13 (22), no. 4, pp. 1412-1420*. (In Russ.)]

7. Корытов К.М., Войткова В.В., Дубровина В.И., Носков А.К., Мищенко А.И., Михайлов Е.П., Балахонов С.В., Щучинов Л.В. Оценка иммунологической эффективности вакцинации населения против чумы в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге // Эпидемиология и вакцинопрофилактика, 2018. Т. 17 (6). С. 87-97. [Korytov K.M., Voitkova V.V., Dubrovina V.I., Noskov A.K., Mishchenko A.I., Mikhailov E.P., Balakhonov S.V., Shchuchinov L.V. Immunological efficiency of human plague vaccination in the Gorno-Altai high-mountain natural plague focus. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention, 2018, Vol. 17 (6), pp. 87-97*. (In Russ.)]

8. Кравцов А.Л., Кожевников В.А., Клюева С.Н., Кудрявцева О.М., Щуковская Т.Н., Микшис Н.И., Бугоркова С.А. Характеристика показателей клеточного иммунитета у вакцинированных против чумы лиц, проживающих на территории Прикаспийского песчаного природного очага чумы // Эпидемиология и вакцинопрофилактика, 2019. Т. 18 (3). С. 67-74. [Kravtsov A.L., Kozhevnikov V.A., Klyueva S.N., Kudryavtseva O.M., Shchukovskaya T.N., Mikshis N.I., Bugorkova S.A. Cellular immune status indicators of anti-plague vaccinated persons, living on the Caspian sandy natural focus territory. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Preventation, 2019, Vol. 18 (3), pp. 67-74*. (In Russ.)]

9. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Евглевский А.А., Нгуен Т.З.Л. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм. Часть 1 // Инфекция и иммунитет, 2017. Т. 17 (3). С. 219-230. [Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtatidze L.V., Kovaleva S.V., Evglevsky A.A., Nguyen T.D.L. The new look at neutrophilic granulocytes: rethinkin gold dogmas. Part 1. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology, 2017, Vol. 7 (3), pp. 219-230.* (In Russ.)].

10. Олиферук Н.С., Пинегин Б.В. Определение фагоцитарного числа лейкоцитов крови по отношению к *Staphylococcus aureus* с помощью проточной цитометрии // Иммунология, 2007. № 4. С. 236-240. [Oliferuk N.S., Pinegin B.V. Determination of blood leukocyte phagocytic number to *Staphylococcus aureus* by flow cytometry. *Immunologiya = Immunologiya, 2007, no. 4, pp. 236-240*. (In Russ.)]

11. Уткин Д.В., Киреев М.Н., Гусева Н.П., Каплун Г.А., Куклев В.Е., Осина Н.А. Разработка биологического микрочипа для выявления антител к антигенам возбудителя чумы // Инфекция и иммунитет, 2019. Т. 9, № 2. С. 393-398. [Utkin D.V., Kireev M.N., Guseva N.P., Kaplun G.A., Kuklev V.E., Osina N.A. A microchip developed for detecting antibodies against plague-derived antigens. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology, 2019, Vol. 9, no. 2, pp. 393-398.* (In Russ.)]

12. 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, перио-

дически вакцинирующихся против чумы // Иммунология, аллергология, инфектология, 2015. № 3. С. 62-68. [Firstova V.V., Kalmantaeva O.V., Gorbatov A.A., Kravchenko T.V., Tyurin E.A., Bondarenko N.L., Dyatlov I.A., Karaulov A.V. Specific humoral and cellular immunity in humans periodically vaccinated against plague. *Immunologiya, allergologiya, infektologiya = Immunology, Allergology, Infectology, 2015, no. 3, pp. 62-68*. (In Russ.)]

13. Cornelius C.A., Quenee L.E., Elli P., Ciletti N.A., Schneewind O. Yersinia pestis IS1541 transposition provides for escape from plague immunity. *Infect. Immunity, 2009, Vol. 77, no. 5, pp. 1807-1816.*

14. Cowan C., Philipovskiy A.V., Wulff-Strobel C., Ye Z., Straley S.C. Anti-LcrV antibody inhibits delivery of Yops by *Yersinia pestis* KIM 5 by directly promoting phagocytosis. *Infect. Immunity, 2005, Vol. 73, no. 9, pp. 6127-6137.*

15. Dudte S.C., Hinnebusch B.J., Shannon J.G. Characterization of Yersinia pestis interactions with human neutrophils *in vitro*. *Front Cell Infect. Microbiol., 2017, no. 7, pp. 358-365.*

16. Gupta-Wright A., Tembo D., Jambo K., Chimbayo E., Mvaya L., Caldwell S., Russell D.G., Mwandumba H.C. Functional analysis of phagocyte activity in whole blood from HIV/Tuberculosis – infected individuals using a novel flow cytometry-based assay. *Front Immunol., 2017, no. 8, 1222.* doi: 10.3389/fimmu.2017.01222.

17. Hasui M., Hirabayashi Y., Kobayashi Y. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. *J. Immunol. Methods, 1989, Vol. 117, pp. 53-58.*

18. Heinzelmann M., Gardner S.A., Mercer-Jones M., Roll A.J., Polk H. Quantitation of phagocytosis in human neutrophils by flow cytometry. *Microbiol. Immunol., 1999, Vol. 43, no. 6, pp. 505-512.*

19. Ison C.A. Whole-blood model. *Methods Mol. Med., 2001, Vol. 66, pp. 317-329.*

20. Jansen W.T.M., Väkeväinen-Anttila M., Käyhty H., Nahm M., Bakker N., Verhoef J., Snippe H., Verheul A.F. Comparison of a classical phagocytosis assay and a flow cytometry assay for assessment of the phagocytic capacity of sera from adults vaccinated with pneumococcal conjugate vaccine. *Clin. Diag. Lab. Immunol., 2001, Vol. 8, no. 2, pp. 245-250.*

21. Kummer L.W., Szaba F.M., Parent M.A., Adamovicz J.A., Hill J., Johnson L.L., Smiley S.T. Antibodies and cytokines independently protect against pneumonic plague. *Vaccine, 2008, Vol. 26, no. 52, pp. 6901-6907.*

22. Miliukienë V., Šiaurys A., Pilinkienë A., Chaaustova L. Flow cytometry measurement of Saccharomyces ceverisiae phagocytosis by neutrophils in mouse blood. *Biologya, 2005, no. 3, pp. 69-73.*

23. Rosales C., Uribe-Querol E. Fc receptors: cell activators of antibody functions. *Adv. Biosci. Biotechnol., 2013, Vol. 4, no. 4, pp. 21-33.*

24. Shannon J.G., Hasenkrug A.M., Dorward D.W., Nair V., Carmody A.B., Hinnebusch B.J. *Yerinia pestis* subverts the dermal neutrophil response in a mouse model of bubonic plague. *mBio, 2013, Vol. 4, no. 5, e00170-13.* doi: 10.1128/mBio.00170-13.

25. Spinner J.L., Cundiff J.A., Kobayashi S.D. Yersinia pestis type III secretion system-dependent inhibition of human polymorphonuclear leukocyte function. *Infect. Immun., 2008, Vol. 76, no. 8, pp. 3754-3760.*

26. White-Owen C., Alexander J.W., Sramkoski R.M., Babcock G.F. Rapid whole-blood microassay using flow cytometry for measuring neutrophil phagocytosis. *J. Clin. Microbiol., 1992, Vol. 30, no. 8, pp. 2071-2076.*

Авторы:

Кравцов А.Л. *— д.м.н., ведущий научный сотрудник отдела иммунологии ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт "Микроб"», г. Саратов, Россия*

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

Кожевников В.А. *— младший научный сотрудник отдела иммунологии ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт "Микроб"», г. Саратов, Россия*

Кудрявцева О.М. *— к.б.н., старший 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*

Authors:

Kravtsov A.L., *PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Department of Immunology, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation*

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

Kozhevnikov V.A., *Junior Research Associate, Department of Immunology, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation*

Kudryavtseva O.M., *PhD (Biology), Senior 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*

Поступила 06.05.2020
Принята к печати 22.03.2021

Received 06.05.2020
Accepted 22.03.2021