

ФАГОЦИТАРНАЯ И ЦИТОКИН-ПРОДУЦИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ МЫШЕЙ ЛИНИИ BALB/C, ПРИВИТЫХ ПРОТИВ ЧУМЫ НА ФОНЕ ИММУНОМОДУЛЯЦИИ ПОЛИОКСИДОНИЕМ

© 2019 г. С. Н. Клюева*, А. Л. Кравцов, С. А. Бугоркова, Т. Н. Щуковская, В. А. Кожевников, А. Ю. Гончарова

*E-mail: klyueva.cvetlana@mail.ru

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

Поступила: 13.12.2018. Принята: 25.08.2019

Полиоксидоний повышает иммуногенность и протективность живой чумной вакцины, но клеточные механизмы, лежащие в основе его иммуномодулирующего эффекта, недостаточно изучены. В настоящей работе с помощью проточной цитометрии исследовали фагоцитарную активность (ФА) гранулоцитов крови привитых и не привитых против чумы мышей BALB/c по отношению к *Yersinia pestis*, *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*. Результаты фагоцитарной реакции учитывали в микрообъемах цельной крови на 3, 7 и 21 сутки иммуногенеза. Спонтанную и Кон-А-индуцированную продукцию цитокинов (IFN- γ и IL-10) оценивали в крови иммуноферментным методом. В одной из групп животных противочумную вакцинацию проводили на фоне иммуномодуляции препаратом полиоксидонием. Установлено, что у интактных мышей ФА гранулоцитов крови в отношении клеток *Y. pestis* вдвое ниже, чем в опытах с клетками *E. coli* и *S. aureus*. Противочумная вакцинация специфически активировала *in vitro* поглотительную способность фагоцитов крови только по отношению к чумным микробам. На фоне иммуномодулирующего эффекта полиоксидония, ФА повышалась в опытах с клетками *Y. pestis* уже на 3 сутки иммуногенеза, что согласуется с известной способностью данного иммуномодулятора стимулировать более ранний антителогенез при противочумной вакцинации. Кроме того, повышение значений фагоцитарных индексов коррелировало с усилением спонтанной и индуцированной продукции цитокинов в образцах крови привитых против чумы животных. Полученные данные отражают зависимость ФА лейкоцитов крови от вида возбудителя, специфических антител и цитокинов. Они свидетельствуют, что способность полиоксидония повышать протективность живой чумной вакцины может быть связана с активацией ФА лейкоцитов по отношению к клеткам чумного микроба.

Ключевые слова: лейкоциты крови, фагоцитоз, *Yersinia pestis*, цитокины, полиоксидоний, проточная цитометрия

DOI: 10.31857/S102872210007044-3

Адрес: 410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, 46, ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Клюева Светлана Николаевна. Тел. 8(452) 26-21-31, Факс: 8(452) 51-52-12.

E-mail: klyueva.cvetlana@mail.ru

Авторы:

Клюева С. Н., к.б.н., н.с. отдела иммунологии ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Россия;

Кравцов А. Л., д.м.н., в.н.с. отдела иммунологии ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Россия;

Бугоркова С. А., д.м.н., заведующая отделом иммунологии ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Россия;

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

Кожевников В. А., м.н.с. отдела иммунологии ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Россия;

Гончарова А. Ю., к.м.н., н.с. отдела иммунологии ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

При моделировании у мышей бубонной чумы в настоящее время установлено, что на вну-

трикожное введение в организм живых клеток *Yersinia pestis* первыми отвечают нейтрофильные гранулоциты, которые принимают активное участие в обезвреживании чумных микробов и эффективность киллинга клеток *Y. pestis* нейтрофилами существенно повышается в присутствии иммунной сыворотки, полученной от мышей, привитых живой чумной вакциной [1]. С другой стороны известно, что существенно повысить иммуногенность и протективность живой чумной вакцины позволяет иммуномодулятор полиоксидоний, который оказывает стимулирующее воздействие на клетки врождённого иммунитета организма хозяина (фагоциты) [2] и стимулирует антилообразование у привитых против чумы лабораторных животных [3].

Хотя специфические антитела к поверхностным бактериальным антигенам (опсонины) и регуляторные цитокины, продуцируемые в плазму крови лимфоцитами, являются «вооружающими» фагоциты факторами, активирующими лейкоцитарный фагоцитоз и киллинг бактерий в иммунном организме [4, 5], клеточные механизмы, лежащие в основе стимулирующего эффекта полиоксидония, недостаточно изучены. В частности, на фоне иммуномодуляции полиоксидонием в динамике иммуногенеза не определялась фагоцитарная и цитокин-продуцирующая активность лейкоцитов крови привитых против чумы мышей в условиях *in vitro*.

Повысить эффективность сравнительной оценки показателей фагоцитарной реакции в опытах с лейкоцитами крови до и после вакцинации позволяет метод проточной цитометрии [6, 7], который способен определять ФА гранулоцитов в 100 мкл цельной крови человека [8, 9] или животного [10] без предварительного выделения из нее фагоцитов и сыворотки. Однако с клетками *Y. pestis* такие исследования не проводились.

Целью настоящей работы явилась оценка в условиях *in vitro* фагоцитарной и цитокин-продуцирующей активности лейкоцитов крови у мышей линии BALB/c, привитых против чумы на фоне иммуномодуляции полиоксидонием.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальной моделью в опытах служили мыши линии BALB/c весом 18–20 г, полученные из отдела экспериментальных животных с виварием РосНИПЧИ «Микроб». Животных выводили из эксперимента в соответствии с «Правилами лабораторной практи-

ки в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ № 267 от 19.06.2003 г. и Национальным стандартом РФ ГОСТ Р 53434–2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Мыши линии BALB/c были разделены на две опытных и одну контрольную группы по 30 особей в каждой. I группу животных иммунизировали подкожно 2-х суточной культурой *Y. pestis* EV НИИЭГ в концентрации $2,5 \times 10^4$ КОЕ. II группе за 1 час до иммунизации *Y. pestis* EV НИИЭГ ($2,5 \times 10^4$ КОЕ) подкожно вводили полиоксидоний (НПО «ПетроваксФарм», Россия) в количестве 4 мкг в 0,2 мл 0,9% раствора натрия хлорида pH 7,2 [2]. Программа экспериментальной работы с животными одобрена Комиссией по биоэтике при ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 2 от 01.02.2018 г.). Контрольную группу составили интактные мыши.

Исследования проводили со штаммами *Y. pestis* EV НИИЭГ, *Escherichia coli* 25922 ATCC и *Staphylococcus aureus* 209-P, полученными из «Государственной коллекции патогенных бактерий» (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»). Культуру клеток *Y. pestis* выращивали на агаре Хоттингера (pH 7,2) в течение 48 ч при 28 °С (*Y. pestis* (28)). Кроме того, готовили культуру клеток *Y. pestis* (*Y. pestis* (37)), обладающую повышенной устойчивостью к лейкоцитарному фагоцитозу [11, 12]. Для этого клетки *Y. pestis* высевали из 28 °С культуры в концентрации 1×10^7 КОЕ на бульон Хоттингера (pH 7,2) и культивировали в условиях аэрации при 37 °С в течение 5 ч.

Культуры *E. coli* и *S. aureus* выращивали на агаре Хоттингера (pH 7,2) в течение 24 ч при 37 °С. Из культур *Y. pestis* (28), *Y. pestis* (37), *E. coli* и *S. aureus* в 0,9% растворе натрия хлорида pH 7,2 готовили по стандартному образцу мутности ОСО 42-28-59-85П взвеси с концентрацией 10^9 м.к./мл, которые обеззараживали нагреванием при 60 °С в течение 1 ч 20 мин [13].

Обеззараженные бактерии окрашивали ФИТЦ (Sigma, США) [7] и готовили по стандарту мутности миллиардные взвеси ФИТЦ-меченых клеток *Y. pestis* (28), *Y. pestis* (37), *E. coli* и *S. aureus* в фосфатно-солевом буфере pH 7,2 (ФСБ) с 5 mM глюкозы и 0,1% желатина (ФСБг) [8], которые разливали в микропробирки и хранили до использования при –20 °С [10].

Фагоцитарную реакцию ставили по методу Miliukienė V. et al. [10], модифицированному нами с учётом методических рекомендаций Nasui M. et al. [8] и White-Owen C. et al. [9]: 100 мкл крови разводили путём добавления 800 мкл ФСБг

и смешивали со 100 мкл миллиардной взвеси исследуемого вида ФИТЦ-меченых бактерий; образцы инкубировали в темноте в течение 15 мин при 37 °С с перемешиванием в шейкере-инкубаторе ES20 (BioSan, Латвия). Фагоцитоз блокировали добавлением 2 мл ФСБ с 3 mM ЭДТА в течение 2 мин, клеточные элементы осаждали центрифугированием (300 g, 5 мин). Осадок ресуспендировали на вортексе в 2 мл разведённого в 10 раз (согласно инструкции) BD FACS Lysing Solution (BD Biosciences, USA) для лизиса эритроцитов и фиксации лейкоцитов в течение 20 мин. Образцы фиксированных клеток можно хранить до 3-х суток при температуре 4 °С.

Непосредственно перед проведением цитофлуориметрического анализа лейкоциты осаждали из FACS Lysing Solution центрифугированием и осадок ресуспендировали в 2 мл ФСБ с 3 mM ЭДТА. Оценку процесса фагоцитоза проводили с помощью проточного цитометра CyAn ADP (DakoCytomation, Дания) по программе Summit v.4.3 Built 2445. Гранулоциты дифференцировали в крови от лимфоцитов и моноцитов по показателям светорассеяния [8] и путём гейтирования по гранулоцитарной популяции определяли в исследуемых образцах значения фагоцитарных индексов (ФИ, %) и средних значений (Mean) фагоцитарных чисел (ФЧ) на клетку в условных единицах интенсивности ФИТЦ-флуоресценции [9, 14].

Для определения продукции цитокинов лейкоцитов крови [13] гепаринизированную мышиную кровь разводили в соотношении 1:4 средой RPMI 1640 (ПанЭко Россия), содержащей 100 мкг/мл гентамицина (ФГУП им. Н.А. Семашко, Россия). В качестве индуктора продукции цитокинов использовали стандартный Т-клеточный митоген конканавалин А (Пан Эко, Россия) в концентрации 15 мкг/мл. Опытные и контрольные образцы инкубировали в течение 24 часов при температуре 37 °С. Клеточные суспензии осаждали центрифугированием при 300 g в течение 15 мин, отбирали супернатанты. Спонтанную и стимулированную конканавалином А продукцию цитокинов определяли методом иммуноферментного анализа с помощью коммерческих наборов для определения IFN- γ и IL-10 (eBioscience, Австрия). Исследования выполняли на автоматическом иммуноферментном анализаторе «LAZURIT» (Dunpex Technologies, USA) при длине волны 450 nm.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием стандартного пакета программ Microsoft Office Excel 2016,

Statistica 10.0 (StatSoft Inc., 2010). Взаимосвязь между переменными определяли с помощью рангового корреляционного анализа по Спирмену. Корреляционные связи считали сильными при коэффициенте корреляции $r=0,7-1,0$, умеренной (средней) силы – при $r=0,3-0,7$, слабыми – при $r=0-0,3$. Достоверность различий сравниваемых величин оценивали с помощью парного t-критерия Стьюдента. Полученные данные представляли в виде медианы (Me) и квартильных отклонений (Q25; Q75).

РЕЗУЛЬТАТЫ

На цитограмме (рис. 1) представлен результат идентификации гранулоцитов по клеточному объёму и по степени внутриклеточной гранулярности с помощью одновременного измерения методом проточной цитометрии для каждого из лейкоцитов крови показателей прямого (малоуглового, FS- Forward Scatter) и бокового (под углом 90°, SS- Side Scatter) светорассеяния. Гранулоциты, обладающие более высокой степенью внутриклеточной гранулярности, выделены по параметру SS в область R1, где более 95% клеток это нейтрофилы [10]. Относительное содержание гранулоцитов в крови контрольной группы мышей было $31,8 \pm 1,4\%$, что является характерным для выбранной линии мышей BALB/c и подтверждается литературными данными [15].

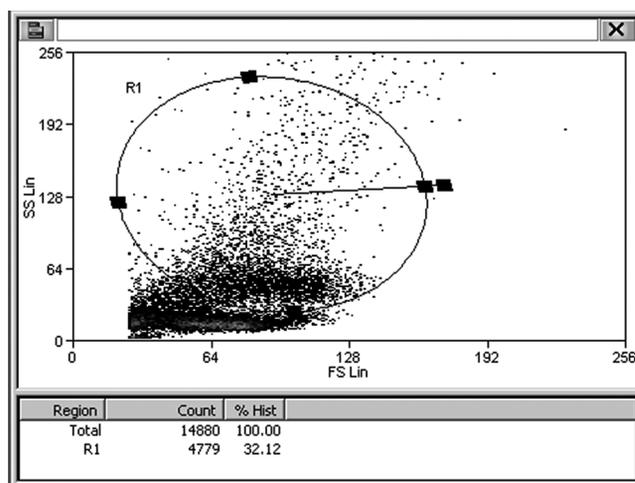


Рис. 1. FS/SS dot plot образца цельной крови интактной мыши линии BALB/c. Представлено характерное распределение отдельных лейкоцитов в образце цельной крови по размеру (FS) и по степени гранулярности (SS). Гранулоциты крови (32,12% клеток) локализируются в области R1 цитограммы.

Гейтирование по области R1 позволяло автоматически регистрировать интенсивность флуоресценции активных фагоцитов и оценивать в крови ФА только гранулоцитов. На рис. 2 представлены частотные распределения отдельных гранулоцитов крови интактной мыши линии BALB/c по ФЧ, измеренные в условных единицах интенсивности ФИТЦ-флуоресценции в опытах с клетками *Y. pestis* (28), *Y. pestis* (37), *E. coli* и *S. aureus*. Они наглядно иллюстрируют зависимость фагоцитарной активности лейкоцитов крови от вида возбудителя, а также от особенностей антигенных свойств *Y. pestis*, зависящих от температуры выращивания микроорганизма (28 °С или 37 °С).

Цитометрический анализ показал, что в контрольной группе при взаимодействии лейкоцитов крови мышей с *Y. pestis* (28) значения ФИ были значительно ниже ($p < 0,0001$), чем ФИ, измеренные в тех же экспериментальных условиях в опытах с клетками *E. coli* и *St. aureus* (табл. 1). Кроме того, ФИ по отношению к *Y. pestis* (28) в среднем были в 1,7 раза выше ($p < 0,0001$), чем в отношении *Y. pestis* (37).

При анализе фагоцитарной активности гранулоцитов крови у животных из I группы в динами-

ке вакцинального процесса (табл. 1) отсутствовали существенные изменения ФИ по отношению к *Y. pestis* (28). Изменяющий реактивность фагоцитов крови мышей полиоксидоний [2], оказывал модулирующий эффект на фагоцитоз в условиях *in vitro*, поскольку у животных II группы ФИ повышались по отношению к *Y. pestis* (28) на 21-е сутки ($p < 0,0001$), а по отношению к *Y. pestis* (37) – начиная с 3-х суток ($p < 0,05$).

Повышение ФЧ для лейкоцитов крови мышей I и II групп отмечали в опытах с клетками *Y. pestis* (37) на 7-е сутки ($p < 0,001$), а в опытах с клетками *Y. pestis* (28) – на 21-е сутки ($p < 0,0001$) иммуногенеза во II группе (табл. 2).

В тех же экспериментальных условиях после иммунизации *Y. pestis* EV НИИЭГ при контакте *in vitro* лейкоцитов крови с клетками *St. aureus* не было выявлено существенных различий в уровне фагоцитарной активности (ФИ). Различия в поглотительной способности гранулоцитов выражались в повышении ФЧ у животных I и II групп ($p < 0,05$) по сравнению с аналогичным показателем в контроле на 3-и сутки иммуногенеза. По отношению к *E. coli* во все сроки после иммунизации снижались ФИ в обеих группах, но повышались ФЧ ($p < 0,05$) гранулоцитов кро-

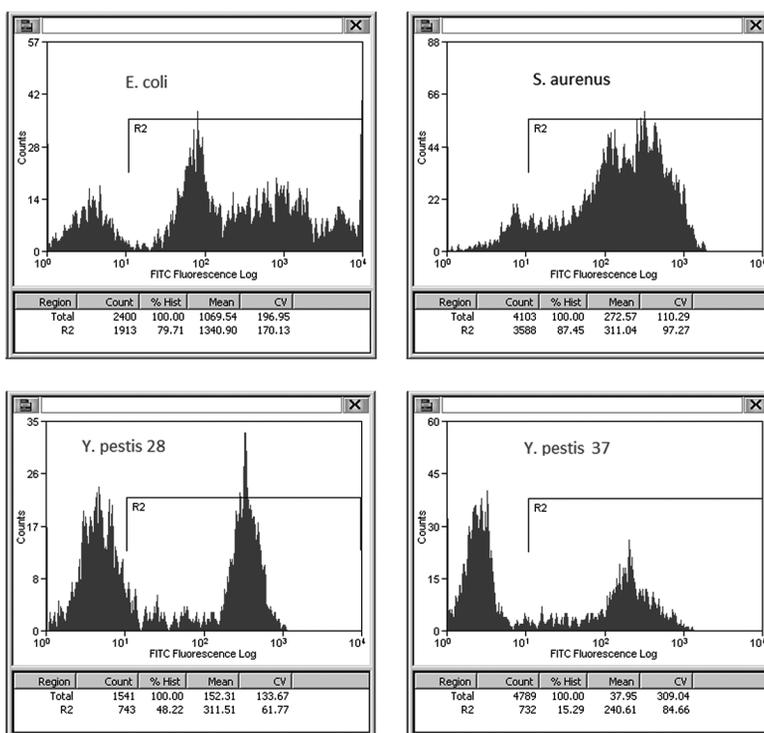


Рис. 2. Примеры гистограмм сравнительной оценки фагоцитарной активности гранулоцитов крови интактной мыши линии BALB/c по отношению к *Y. pestis* (28), *Y. pestis* (37), *E. coli* и *St. aureus*. Активные фагоциты локализируются на гистограммах в области R2.

Таблица 1. Фагоцитарные индексы (ФИ) гранулоцитов крови мышей линии BALB/c по отношению к *Y.pestis*, *E. coli* и *St. aureus* при противочумной вакцинации и иммуномодуляции полиоксидонием

Группа	Срок забора крови (сутки)	ФИ (%), Me (Q25; Q75)			
		<i>Y.pestis</i> (28)	<i>Y.pestis</i> (37)	<i>E. coli</i>	<i>St. aureus</i>
I	3	30,54(24,54; 33,02)	16,04(15,73; 16,95)	51,60(41,34; 57,30)*	88,97(87,10; 90,93)
II		35,48(11,66; 41,63)	21,59(15,65; 26,73)**	47,29(45,81; 49,19)*	90,97(89,34; 91,05)
I	7	27,49(27,26; 30,79)*	18,72(17,78; 29,41)*	50,60(47,3; 51,34)*	88,93(86,8; 89,97)
II		38,10(20,29; 48,76)	23,31(16,49; 28,14)*	43,81(39,19; 50,29)**	91,65(90,78; 97,69)**
I	21	33,43(33,25; 34,15)	21,82(21,57; 27,16)*	43,52(36,63; 50,57)*	90,97(87,46; 91,93)
II		54,36(50,59; 54,97)**	26,03(25,51; 28,24)**	49,19(48,81; 49,29)**	90,05(88,69; 93,97)
Контроль	3, 7, 21	35,79(27,29; 38,75)	16,53(14,7; 19,5)	76,88(71,11; 77,75)	87,89(87,09; 88,29)

Примечание: *статистически значимые различия по сравнению с показателями в контрольной группе; **статистически значимые различия между показателями I и II групп.

Таблица 2. Фагоцитарные числа (ФЧ) гранулоцитов крови мышей линии BALB/c по отношению к *Y.pestis*, *E. coli* и *St. aureus* при противочумной вакцинации и иммуномодуляции полиоксидонием

Группа	Срок забора крови (сутки)	ФЧ (y.e.), Me (Q25; Q75)			
		<i>Y.pestis</i> (28)	<i>Y.pestis</i> (37)	<i>E. coli</i>	<i>St. aureus</i>
I	3	193,66 (183,34; 217,78)	201,25 (168,62; 213,69)	249,5 (202,9; 327,7)*	330,10(313,67; 351,32)*
II		171,36 (133,08; 182,32)	208,61 (186,59; 209,56)*	189,82(167,53; 240,63)**	351,86(275,77; 379,21)*
I	7	193,20 (191,9; 196,50)	223,73 (219,45; 225,14)*	249,50(202,90;327,70)*	334,1(319,63; 354,35)
II		215,80 (196,80; 257,10)	220,96(211,01; 223,21)*	189,82(167,53; 240,63)*	351,86(298,73; 382,34)
I	21	166,40(153,28; 181,06)	169,0(158,70; 219,60)	249,50(202,90; 327,70)*	330,10(309,77; 348,37)
II		285,47(278,35; 325,3)**	149,89(148,18; 202,96)	89,82(167,53; 240,63)*	346,92(285,44; 371,08)
Контроль	3, 7, 21	228,28 (135,22; 227,79)	178,76(112,96; 210,24)	137,90(131,50; 141,80)	271,60(257,60; 275,90)

Примечание: *статистически значимые различия по сравнению с показателями в контрольной группе; **статистически значимые различия между показателями I и II групп.

ви у привитых против чумы мышей (I группа) в сравнении с контролем (табл. 1, 2).

Иммуноферментный анализ супернатантов крови мышей линии BALB/c показал, что уровни спонтанной и КонА-индуцированной продукции цитокинов (IFN- γ и IL-10) в опытных группах на 3-и, 7-е и 21-е сутки иммунного ответа статистически достоверно превышали ($p < 0,001$) аналогичные показатели контрольной группе (табл. 3). Причём во все сроки исследования у животных II группы показатели спонтанной и КонА-индуцированной продукции IL-10 превышали аналогичные показатели у животных I группы ($p < 0,0001$).

Установлен ряд сильных зависимостей между показателями фагоцитарной активности и концентрациями цитокинов. Так, в I группе животных ФИ коррелировали с концентрациями IL-10 при спонтанной продукции на 21-е сутки исследования ($r=0,86$, $p=0,002$), а с концентрациями IFN- γ при КонА-индуцированной продукции — на 7-е и 21-е сутки ($r=0,93$, $p=0,0002$; $r=0,85$, $p=0,003$ соответственно). Показатели ФЧ коррелировали с концентрациями IL-10 при спонтанной продукции на 7-е сутки ($r=0,76$, $p=0,015$).

Во II группе сильная корреляция выявлена между ФИ и количеством IL-10 при спонтанной продукции на 7-е и 21-е сутки ($r=0,93$,

Таблица 3. Продукция цитокинов лейкоцитами крови мышей BALB/c на фоне противочумной вакцинации и иммуномодуляции полиоксидонием

Группа	Срок забора крови (сутки)	Продукция IFN- γ , пг/мл		Продукция IL-10, пг/мл	
		Спонтанная	КонА-индуцированная	Спонтанная	КонА-индуцированная
		Me (Q25; Q75)			
I	3	55,73(50,804; 68,60)*	82,06 (56,06; 99,23)**	33,10(23,0; 37,90)*	38,50(24,50; 43,0)*
	7	59,68(59,41; 76,76)*	76,72 (64,16; 81,94)*	31,30(20,80; 34,90)*	33,70(24,50; 46,50)*
	21	55,06(43,33; 63,83)*	64,10(55,14; 67,89)*	18,50(11,10; 21,10)*	23,80(17,10; 25,60)**
II	3	58,89(48,34; 64,42)*	67,10(66,27; 81,83)*	63,10(54,10; 80,60)**	86,0(71,2; 120,9)**
	7	63,72(53,21; 76,58)*	65,61(65,51; 78,14)*	69,70(54,90; 80,80)**	71,50(67,90; 91,5)**
	21	47,98(44,84; 51,16)*	68,94(63,02; 70,84)*	62,50(42,10; 63,0)**	67,70(42,10; 73,0)**
Контроль		28,43 (21,25;35,17)	53,51 (31,74;55,95)	11,2 (8,85;11,55)	16,1 (14,8;16,3)

Примечание: *статистически значимые различия по сравнению с показателями в контрольной группе; **статистически значимые различия между показателями I и II групп ($p < 0,05$).

$p=0,0002$ и $r=0,90$, $p=0,0009$). Корреляционные зависимости установлены между ФЧ и количеством IFN- γ при КонА-индуцированной продукции ($r=0,70$, $p=0,03$) на 3-и сутки, между ФЧ и уровнем IFN- γ при спонтанной и КонА-индуцированной продукции на 7-е ($r=0,76$, $p=0,01$ и $r=0,68$, $p=0,04$ соответственно) и 21-е сутки иммуногенеза ($r=0,78$, $p=0,01$ и $r=0,81$, $p=0,007$ соответственно).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе с использованием точной цитометрии получены экспериментальные данные, которые подтверждают современное положение о зависимости фагоцитарной активности гранулоцитов крови от вида и биологических свойств возбудителя [16], от наличия в организме активных при фагоцитозе специфических антител (опсонинов) к поверхностным бактериальным антигенам [5–7].

Низкие значения ФИ гранулоцитов крови у контрольных животных в отношении бактерий *Y. pestis* (28) и *Y. pestis* (37), в сравнении с ФИ, зарегистрированными в опытах с бактериями *E. coli* и *St. aureus*, можно объяснить недостатком опсонизирующих факторов, а именно, отсутствием в крови специфических антител к поверхностным антигенам чумного микроба. Причём, клетки *Y. pestis* (37) поглощались гранулоцитами крови интактных мышей менее эффективно, чем *Y. pestis* (28), что полностью согласуется с вы-

водами исследователей, установивших ингибирующее воздействие на фагоцитарную функцию лейкоцитов крови человека и животных поверхностных антигенов *Y. pestis* (капсульный антиген F1, *Yersinia outer proteins* и др.), синтезируемых при температуре 37°С [11, 12].

Противочумная иммунизация в условиях иммуномодуляции стимулировала у мышей поглотительную способность гранулоцитов крови по отношению к клеткам *Y. pestis* (37), начиная уже с 3-х суток иммуногенеза, что согласуется с литературными данными о более ранней продукции специфических антител к капсульному антигену F1 у животных, привитых вакциной живой чумной на фоне иммуномодулирующего эффекта полиоксидония [3].

На 21-е сутки иммуногенеза, в период формирования у мышей наиболее напряжённого приобретенного противочумного иммунитета [17], в условиях иммуномодуляции существенно возрастали ФИ по отношению к клеткам *Y. pestis* (28). Однако в группе I, где иммунизация проводилась без иммуномодуляции, таких изменений не регистрировали. Возможно по той причине, что на фоне иммуномодулирующего эффекта полиоксидония у мышей линии BALB/c формируется по нашим данным в 2,7 раза более эффективная защита от заражения вирулентным штаммом *Y. pestis* [2].

По-видимому, повышение уровня фагоцитарной активности лейкоцитов крови по отношению к *Y. pestis* отражает специфичность

происходящей в организме иммунологической перестройки, поскольку такие изменения отсутствовали в опытах с клетками золотистого стафилококка и кишечной палочки. Наоборот, при использовании *E. coli*, мы отмечали снижение значений ФИ.

Способность нейтрофилов отвечать функциональной активацией на специфические иммунные комплексы антиген-антитело зависит, как известно, от их прайминга, индуцируемого *in vivo* первичным контактом с бактериальными ЛПС [15] и иммунорегуляторными цитокинами [5]. В пользу этого свидетельствуют выявленные корреляционные взаимосвязи между изменениями в уровнях фагоцитарной и цитокин-продуцирующей активности лейкоцитов в процессе формирования специфического противочумного иммунитета.

Таким образом, предварительное введение полиоксидония перед противочумной вакцинацией стимулирует фагоцитарную и цитокин-продуцирующую активность лейкоцитов крови по отношению к чумному микробу, что согласуется с современными представлениями о механизме действия этого биологически активного препарата и свидетельствует о возможности его использования с целью повышения эффективности противочумной вакцинации. Применение проточной цитометрии для быстрой и объективной оценки показателей фагоцитарной реакции в микрообъемах цельной крови может способствовать повышению производительности и информативности исследований, направленных на разработку теста *in vitro* определения уровня клеточного противочумного иммунитета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Shannon J. G., Hasenkrug A. M., Dorward D. W., Nair V., Carmody A. B., Hinnebusch B. J. *Yersinia pestis* subverts the dermal neutrophil response in a mouse model of bubonic plague. *Mbio* 2013, 4, e00170-e00113.10.1128/mbio.00170-13.
2. Кравцов А. Л., Курьлина А. Ф., Клюева С. Н., Шуковская Т. Н. Модулирующий эффект полиоксидония на реактивность клеток иммунной системы при формировании противочумного иммунитета. *Иммунология* 2016, 37(6), 320–325. [Kravtsov A. L., Kurylina A. F., Klyueva S. N., Shchukovskaya T. N. The modulating effect of polyoxidonium on the reactivity of cells of the immune system during the formation of anti-plague immunity. *Immunology* 2016, 37 (6), 320–325].
3. Пономарева Т. С., Дерябин П. Н., Каральник Б. В., Тугамбаев Т. И., Атишбар Б. Б., Денисова Т. Г., Закарян С. Б., Мельникова Н. Н. Влияние полиоксидония на иммуногенную и протективную активность живой чумной вакцины. *Иммунология* 2014, 5, 286–290. [Ponomareva T. S., Deryabin P. N., Karalnik B. V., Tugambaev T. I., Atshabar B. B., Denisova T. G., Zakaryan S. B., Mel'nikova N. N. The impact of polyoxidonium on immunogenic and protective activity alive plague vaccine. *Immunology* 2014, 5, 286–290].
4. Хаитов Р. М., Пинегин Б. В. Основные задачи клинической иммунологии по изучению функциональной активности фагоцитирующих клеток. *Иммунология* 1995, 3, 6–10. [Khaitov R. M., Pinegin B. V. The main objects of clinical immunology for the study of the functional phagocytic cell activity. *Immunology* 1995, 3, 6–10].
5. Нестерова И. В., Колесникова Н. В., Чудилова Г. А., Ломтатидзе Л. В., Ковалева С. В., Евлевский А. А., Нгуен Т. З. Л. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм. Часть 1 // *Инфекция и иммунитет* 2017, 7(3), 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: rethinking old dogmas. Part 2. *Russian Journal of Infection and Immunity* 2017, 7(3), 219–230].
6. 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. Immunology* 2001, 8(2), 245–250.
7. Ison C. A. Whole-blood model. *Methods Mol Med* 2001, 66, 317–329.
8. 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, 117, 53–58
9. 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. Microbiology* 1992, 30 (8), 2071–2076.
10. Miliukienė V., Šiaurys A., Pilinkienė A., Chaustova L. Flow cytometry measurement of *Saccharomyces cerevisiae* phagocytosis by neutrophils in mouse blood. *Biologiya* 2005, 3, 69–73.
11. Spinner J. L., Cundiff J. A., Kobayashi S. D. *Yersinia pestis* type III secretion system-dependent inhibition of human polymorphonuclear leukocyte function. *Infect. Immunity* 2008, 76 (8), 3754–3760.
12. Du Y., Rosqvist R., Forsberg A. Role of fraction 1 antigen of *Yersinia pestis* in inhibition of phagocytosis. *Infect. Immun.* 2002, 70, 1453–1460.
13. Клюева С. Н., Шуковская Т. Н. Влияние адьювантов нового поколения *in vitro* на продукцию цитокинов клетками крови вакцинированных против чумы лиц. *Российский иммунологический журнал* 2015, 9(18), 2, 201–208. [Klyueva S. N., Schukovskaya T. N. Adjuvants influence of new generation *in vitro* cytokine production by blood cells vaccinated against plague persons. *Russian Journal of Immunology* 2015, 9 (18), 2, 201–208].

14. Олиферук Н. С., Пинегин Б. В. Определение фагоцитарного числа лейкоцитов периферической крови по отношению к *Staphylococcus aureus* с помощью проточной цитометрии. Иммунология 2007, 4, 236–240. [Oliferuk N. S., Pinegin B. V. The phagocytic number definition of peripheral blood leukocytes in the ratio *Staphylococcus aureus* with flowing cytofluorimetry. Immunology 2007, 4, 236–240].
15. Landoni V. I., Chiarella P., Martire-Greco D., Schierloh P., van-Rooijen N., Rearte B., Palermo M. S., Isituriz M. A., Fernandez G. C. Tolerance to lipopolysaccharide promotes an enhanced neutrophil extracellular traps formation leading to a more efficient bacterial clearance in mice. Clinical and Experimental Immunology 2012, 168, 153–163.
16. Исачкова Л. М., Плехова Н. Г. К развитию представлений об антиинфекционной резистентности. Эпидемиология и инфекционные болезни 2002, 1, 11–15. [Isachkova L. M., Plekhova N. G. To the development of ideas about anti-infectious resistance. Epidemiology and infectious diseases 2002, 1, 11–15].
17. Девдариани З. Л., Терешкина Н. Е., Тараненко Т. М., Киреев М. Н., Терехова И. В., Григорьева Г. В., Исляева М. Н., Ермаков Н. М., Виноградова Н. А., Малахаева А. Н. Результаты модельных экспериментов по конструированию тест-системы иммуноферментной для выявления антител к Ф1 чумного микроба (ИФА-Ат-Ф1 *Yersinia pestis*). Проблемы особо опасных инфекций 2013, 1, 74–77. [Devdariani Z. L., Tereshkina N. E., Taranenko T. M., Kireev M. N., Terekhova I. V., Grigor'eva G. V., Grigor'eva G. V., Islyayeva M. N., Ermakov N. M., Vinogradova N. A., Malakhaeva A. N. The results of model experiments on the construction of enzyme immunoassay test system for the detection of antibodies to the F1 *Y. pestis* (IFA-AT-F1 *Yersinia pestis*). Problems of Particularly Dangerous Infections 2013, 1, 74–77].

BLOOD LEUKOCYTE PHAGOCYtic AND CYTOKINE-PRODUCING ACTIVITY OF ANTI-PLAGUE VACCINATED BALB/C LINE MICE AGAINST THE BACKGROUND OF IMMUNOMODULATION BY POLYOXIDONIUM

© 2019 S. N. Klyueva*, A. L. Kravtsov, S. A. Bugorkova, T. N. Schukovskaya, V. A. Kozhevnikov, A. Yu. Goncharova

*E-mail: klyueva.cvetlana@mail.ru

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

Received: 13.12.2018. Accepted: 25.08.2019

Polyoxidonium increases the immunogenicity and protection of the live plague vaccine, but the cellular mechanisms underlying its immunomodulating effect are not well understood. In present study, the blood granulocyte phagocytic activity (PA) of anti-plague vaccinated and not vaccinated BALB/c mice in relation to *Yersinia pestis*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* was investigated using flow cytometry. The results of the phagocytic reaction were taken into account in the microvolumes of whole blood on days 3, 7 and 21 of immunogenesis. Spontaneous and CoA-induced cytokine production (IFN- γ and IL-10) was evaluated in the blood by an ELISA method. In one of the groups of animals, anti-plague vaccination was carried out against the background of immunomodulation with a polyoxidonium. It was established that in intact mice the blood granulocyte PA in relation to *Y. pestis* cells is twice as low as in experiments with *E. coli* and *S. aureus* cells. Anti-plague vaccination specifically activated *in vitro* the blood granulocyte absorptive capacity only in relation to plague microbes. Against the background of the polyoxidonium immunomodulating effect, PA increased in experiments with *Y. pestis* cells already on the 3rd day of immunogenesis, which is consistent with the known ability of this immunomodulator to stimulate earlier antibody genesis during anti-plague vaccination. In addition, an increase in phagocytic index values correlated with an increase in spontaneous and induced cytokine production in blood samples of animals vaccinated against the plague. The data obtained reflect the dependence of blood leukocyte PA from the pathogen type, specific antibodies and cytokines. They indicate that the polyoxidonium ability to increase the live plague vaccine protectivity may be associated with the activation of leukocyte PA to plague microbes.

Key words: blood leukocytes, phagocytosis, *Yersinia pestis*, cytokines, polyoxidonium, flow cytometry

Authors:

Klyueva S. N., ✉ PhD (Biology), Researcher, Department Immunology Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russia. **E-mail:** klyueva.cvetlana@mail.ru;

Kravtsov A. L., PhD, MD (Biology), Leading Researcher, Department Immunology Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russia;

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

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

Kozhevnikov V. A., Junior Researcher, Department of Immunology, Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russia;

Goncharova A. Y., PhD (Medicine), Researcher, Department Immunology Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russia.