

УДК 616.98:579.842.23

DOI: 10.14427/jipai.2024.3.95

## Цитометрическая оценка интенсивности повреждения гранулоцитов крови привитых против чумы морских свинок при взаимодействии с *Yersinia pestis* на модели бактериемии *ex vivo*

А.Л. Кравцов, А.Ю. Гончарова, С.Н. Ключева, С.А. Бугоркова

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов

## Cytometric assessment of blood granulocyte damage intensity in vaccinated guinea pigs upon interaction with *Yersinia pestis* in an *ex vivo* bacteremia model

A.L. Kravtsov, A.Yu. Goncharova, S.N. Klyueva, S.A. Bugorkova

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

### Аннотация

Нейтрофильные гранулоциты (НГ) играют важную роль в механизмах формирования иммуноаллергических реакций и способны посредством нетоза уничтожать внеклеточные патогены. Цель работы заключалась в оценке методом проточной цитометрии интенсивности повреждения НГ в крови иммунизированных против чумы и интактных морских свинок при моделировании чумной бактериемии *ex vivo*.

**Материалы и методы.** Морских свинок (26 особей) иммунизировали подкожно вакцинным штаммом *Y. pestis* EV НИИЭГ и тремя его изогенными производными, группы сравнения составляли интактные животные. На 21-е сутки иммуногенеза у морских свинок опытных групп и группы сравнения забирали кровь из сердца в объёме 4-5 мл. Бактериемию моделировали *ex vivo* добавлением в образцы крови  $10^8$  м.к./мл чумного микроба, выращенного при 37°C (Yp37), 28°C (Yp28) или инактивированные нагреванием при 60°C культуры – DYp28 и DYp37. Для каждой из групп контролем служили образцы крови без добавления бактерий. Через 4 ч инкубации *ex vivo* образцы фиксировали и обеззараживали с помощью реактива BD FACS Lysing solution и учитывали реакцию НГ методом проточной цитометрии. При оценке реакции НГ повреждёнными считали клетки, утратившие исходно высокую степень гранулярности в процессе секреторной дегрануляции и цитолиза. Показатель повреждения нейтрофилов (ППН) вычисляли как  $D^k - D^o/D^k$ , где  $D^o$  и  $D^k$  – относительное содержание НГ с исходной степенью гранулярности соответственно в опыте и контроле.

**Результаты.** Только в образцах крови предварительно иммунизированных животных регистрировали дегенеративные изменения гранулоцитов в ответ на добавление *ex vivo* в кровь Yp37. Отмечено, что реакция НГ у животных, иммунизированных вакцинным штаммом, была в 3 раза выше, чем у морских свинок, иммунизированных изогенными вариантами этого штамма, которые в 200 раз менее эффективно защищали морских свинок от чумы.

### Summary

Neutrophil granulocytes (NG) play an important role in the mechanisms of immunoallergic reaction and are capable of destroying extracellular pathogens through NETosis. The aim of the work was to evaluate by flow cytometry the intensity of NG damage in the blood of plague-immunized and intact guinea pigs when modeling plague bacteremia *ex vivo*.

**Materials and methods.** Guinea pigs (26 individuals) were immunized subcutaneously with the vaccine strain *Y. pestis* EV NIIEG and three of its isogenic derivatives; the comparison group consisted of intact animals. On the 21st day of immunogenesis, blood was taken from the heart in a volume of 4-5 ml from guinea pigs in the experimental and comparison groups. Bacteremia was modeled *ex vivo* by adding  $10^8$  mc/ml of *Y.pestis* grown at 37°C (Yp37), 28°C (Yp28) or cultures inactivated by heating at 60°C – DYp28 and DYp37 – to blood samples. For each group, blood samples without added bacteria served as controls. After 4 h of *ex vivo* incubation, the samples were fixed and disinfected using the BD FACS Lysing solution reagent, and the NG reaction was taken into account by flow cytometry. When assessing the NG reaction, cells were considered damaged if they had lost their initially high degree of granularity in the process of secretory degranulation and cytolysis. The neutrophil damage index (NDI) was calculated as  $D^k - D^o/D^k$ , where  $D^k$  and  $D^o$  are the relative content of NG with the initial degree of granularity, respectively, in the control and experiment.

**Results.** Degenerative changes in granulocytes were recorded only in blood samples from pre-immunized animals in response to the *ex vivo* addition of Yp37 to the blood. It was noted that the NG response in animals immunized with the vaccine strain was 3 times higher than in guinea pigs immunized with isogenic variants of this strain, which were 200 times less effective in protecting guinea pigs from plague.

**Conclusion.** The results of cytometric assessment of NDI in an *ex vivo* model of plague bacteremia can be used to characterize the severity of post-vaccination anti-plague immunity.

**Заключение.** Результаты цитометрической оценки ППН на модели чумной бактериемии *ex vivo* могут быть использованы для характеристики выраженности поствакцинального противочумного иммунитета.

### **Ключевые слова**

Нейтрофильные гранулоциты, IgG-опосредованная анафилаксия, *Yersinia pestis*, модель бактериемии *ex vivo*, нетоз, противочумная вакцинация, проточная цитометрия.

### **Введение**

В организме морских свинок и людей, иммунизированных живой чумной вакциной, наряду с иммунологической, происходит, как известно, иммуноаллергическая перестройка, и для учёта индивидуальной чувствительности макроорганизма к патогену или продуктам его жизнедеятельности ранее была предложена внутрикожная проба со специфическим аллергеном пестином, по аналогии с другими аллергенами (туберкулин, тулярин и др.), которая служила объективным показателем развития клеточного иммунитета и сформированной устойчивости организма к инфекции [1]. Но так как применение кожных тестов сопряжено с определёнными рисками для здоровья обследуемого, непрерывно идёт поиск возможностей их замены антигенспецифическими клеточными тестами *in vitro*. Так, со специфическим аллергеном пестином был предложен ряд *in vitro* тестов: реакция лейкоцитолитической [2], тест ППН (показатель повреждения нейтрофилов) [3] с микроскопическим учётом результата и реакция активации базофилов [4] с цитофлуориметрическим вариантом учёта результатов.

Тест ППН, результаты которого отражали наличие в организме циркулирующих специфических антител, с точки зрения постоянства и воспроизводимости метода имел явное преимущество перед кожной пробой, но для адекватной трактовки его результатов и обоснования механизма реакции требовались дальнейшие экспериментальные исследования [3]. Особого внимания заслуживают в связи с этим современные представления о существовании альтернативного (или дополнительного) IgG-обусловленного пути развития аллергических и анафилактических реакций, не зависящего от IgE, базофилов, тучных клеток и гистамина, в котором, как оказалось, ключевую роль играют нейтрофильные гранулоциты (НГ). При взаимодействии с иммунными комплексами антиген-IgG НГ продуцируют во внеклеточное пространство лейкоцитарные протеазы широкой субстратной специфичности и большое количество активирующего тромбоциты фактора [5,6]. Ранее было отмечено,

### **Keywords**

Neutrophil granulocytes, IgG-mediated anaphylaxis, *ex vivo* bacteremia model, NETosis, anti-plague vaccination, flow cytometry.

что при кожных аллергических реакциях у людей интенсивность местного воспаления через 4 ч после внутрикожного введения аллергена строго коррелирует с уровнем активности высвобождаемой из гранул нейтрофилов лейкоцитарной эластазы (ЛЭ) [7], ответственной за деструкцию эластина кожи и других органов, эндотелия сосудов и широкого спектра белков плазмы крови, включая факторы коагуляции и фибринолиза, а также быстрое избирательное расщепление факторов вирулентности патогенных бактерий [8].

Теоретическую основу разрабатываемого нами теста для *ex vivo* оценки эффективности противочумного иммунитета составили данные о том, что при наличии в организме хозяина IgG антител к специфическому антигену праймированные НГ крови будут отвечать на повторный контакт с данным антигеном активацией кислородного метаболизма [9], а также дегенеративными изменениями в ядрах и цитоплазматических гранулах [10], предшествующими аутолизису этих клеток (нетозу) с высвобождением во внеклеточное пространство ДНК-сетей нейтрофильных внеклеточных ловушек (Neutrophil Extracellular Traps-NETs) с высоким содержанием молекул ЛЭ [5,11]. С помощью механизма нетоза, играющего решающую роль в предотвращении сепсиса [12], реализуется в плазме крови феномен внеклеточной антителозависимой цитотоксичности НГ [13]. Ранее нами была установлена в опытах на мышцах способность противочумной вакцинации оказывать праймирующий эффект на НГ ранее иммунизированных животных, в результате чего клетки врождённого иммунитета приобретали способность отвечать *in vivo* и *in vitro* на повторный контакт со специфическим антигеном интенсивным аутолизисом с формированием ДНК-сетей NETs во внеклеточном пространстве [14]. Приступая к разработке теста оценки эффективности противочумной вакцинации, мы поставили цель – оценить с помощью проточной цитометрии интенсивность повреждения НГ в крови иммунизированных против чумы и интактных морских свинок при моделировании чумной бактериемии *ex vivo*.

## Материалы и методы

Морских свинок подкожно иммунизировали вакцинным штаммом *Y. pestis* EV НИИЭГ (Pgm<sup>-</sup>, pFra<sup>+</sup>, pCad<sup>+</sup>, pPst<sup>+</sup>), а также тремя его изогенными производными KM216 (Pgm<sup>-</sup>, pFra<sup>-</sup>, pCad<sup>-</sup>, pPst<sup>+</sup>), KM217 (Pgm<sup>-</sup>, pFra<sup>-</sup>, pCad<sup>+</sup>, pPst<sup>-</sup>), KM218 (Pgm<sup>-</sup>, pFra<sup>-</sup>, pCad<sup>-</sup>, pPst<sup>-</sup>), имеющими отличный плазмидный профиль и менее иммуногенными для этой био-модели [15]. Для иммунизации использовали двухсуточные агаровые культуры вакцинного штамма и его производных, выращенные при температуре 28°C, которые вводили подкожно в область правого бедра в дозе  $1 \times 10^5$  КОЕ. Всего в эксперимент было взято 26 морских свинок по 5 животных в каждую из 4-х опытных групп и 6 интактных морских свинок (группа сравнения). Работа с экспериментальными животными была одобрена Комиссией по биоэтике при ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора» (протокол № 3 от 15.04.2022). Все манипуляции с животными проводили в соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики (утверждены Министерством здравоохранения Российской Федерации 01.04.2016 № 199Н) и рекомендациями Commission of the European Communities, 86/609/ЕЕС.

Для моделирования бактериемии *ex vivo* использовали живые клетки 18-часовой экспоненциальной культуры *Y. pestis* EV, выращенной в условиях аэрации на бульоне LB при 37°C (Yp37). Кроме того, в опытах *ex vivo* для сравнения использовали в качестве аллергенов живые клетки двухсуточной агаровой культуры вакцинного штамма EV, выращенной при 28°C (Yp28), а также инактивированные нагреванием при 60°C культуры [1] – Yp28 (DYp28) и Yp37 (DYp37).

На 21-е сутки иммуногенеза, в период формирования у животных наиболее напряжённого поствакцинального противочумного иммунитета [15], забирали в пластиковые пробирки с гепарином кровь из сердца иммунизированных и интактных морских свинок. Затем по 1 мл крови каждого животного помещали в 5 пластиковых пробирок объёмом 5 мл. В четыре из них (опытные пробы) добавляли по 100 мкл из миллиардных взвесей Yp37, Yp28, DYp37, DYp28 (в дозе  $10^8$  м.к./мл), а в пятую – 100 мкл физиологического раствора (контрольная проба). После перемешивания опытные и контрольные пробы помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор с температурой 37°C, где их инкубировали 4 ч. Время инкубации выбирали, опираясь на имеющиеся данные о формировании наиболее интенсивных дегенеративных изменений в нейтрофилах именно в этот интервал [5,11,13,16]. После

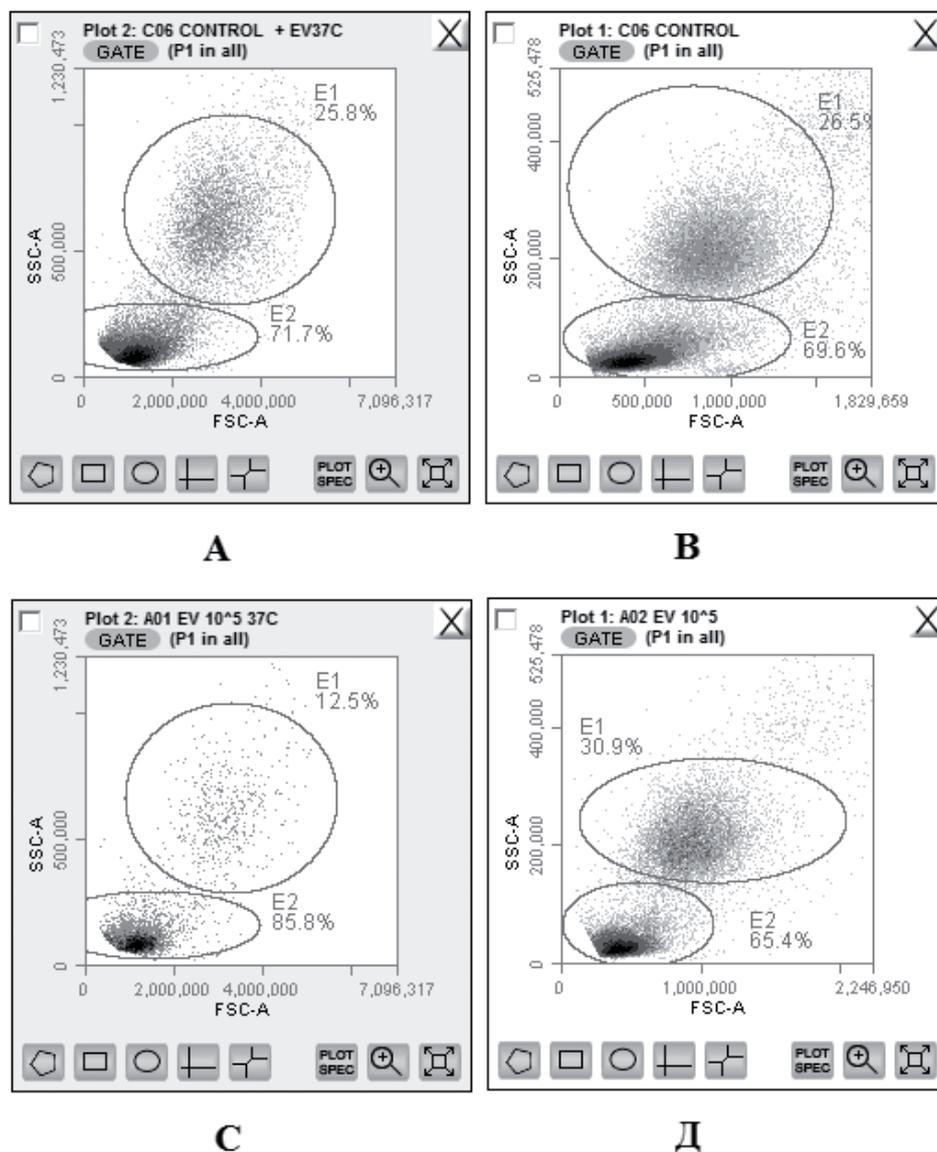
инкубации по 50 мкл крови из каждой пробы добавляли в заранее приготовленные пробирки для проточной цитометрии, содержащие по 1 мл разбавленного в 10 раз деионизованной водой BD FACS Lysing solution (USA). После лизиса эритроцитов и фиксации лейкоцитов (20 мин при комнатной температуре), проводили анализ лейкоцитарных взвесей методом проточной цитометрии согласно Lyse/No-Wash протоколу [17].

В работе был использован проточный цитофлуориметр марки BD Accuri™ Flow Cytometer (USA) для автоматического измерения в потоке клеточных параметров прямого и бокового светорассеяния, что соответствовало анализу отдельных лейкоцитов крови по клеточному объёму и клеточной гранулярности. Фагоциты крови морских свинок, среди которых до 90% клеток составляли НГ [10], дифференцировали по степени внутриклеточной гранулярности от лимфоцитов [9]. В каждом опытном образце и в соответствующем ему контроле определяли долю фагоцитов (в %) с гранулярностью, характерной для нейтрофилов крови интактных животных, обозначая эти показатели, соответственно, как D<sup>o</sup> и D<sup>k</sup>. Из этих данных вычисляли процент повреждённых нейтрофилов (D<sup>k</sup> – D<sup>o</sup>), утративших к 4 ч инкубации в опытных образцах со специфическим антигеном свою исходно высокую внутриклеточную гранулярность в результате цитолиза или дегрануляции. По результатам цитометрического анализа вычисляли значения ППН как (D<sup>k</sup> – D<sup>o</sup>)/D<sup>k</sup>. Подробно пример расчёта с помощью цитограмм приведён в примечании к рисунку 1. В основу принципа определения ППН положен подход оценки дегенеративных изменений в клетках с помощью световой микроскопии, используемый в опытах с различными бактериальными аллергенами [10].

Полученные экспериментальные данные статистически обрабатывали с использованием стандартного пакета программ «Microsoft Office Excel 2016», «Statistica 10.0» («StatSoft Inc.») и представляли в виде медианы (Me) и квартильных отклонений (Q25-Q75) с расчётом достоверности различий в исследуемых группах с использованием U-критерия Манна-Уитни. Значение  $p < 0,05$  считали статистически значимым.

## Результаты и обсуждение

При сравнительном цитометрическом анализе образцов крови после добавления в них Yp37 выявляли выраженные различия в уровне дегрануляции и цитолиза НГ в опытных (иммунизированные морские свинки) и контрольных (интактные животные) образцах. Степень этих



**Рис. 1. Повреждение гранулоцитов крови иммунизированной против чумы морской свинки при моделировании бактериемии *ex vivo* (С - опыт; Д - контроль), на фоне фактического отсутствия аналогичной реакции на специфический антиген в крови интактного животного (А - опыт; В - контроль)**

Примечание: результаты анализа получены через 4 ч после добавления Yp37 в кровь иммунизированной и интактной морской свинки; на каждой из 4-х цитограмм представлено распределение лейкоцитов крови по клеточному объёму (FSC-A) и степени внутриклеточной гранулярности (SSC-A), где гранулоциты крови (нейтрофилы) локализируются по показателю гранулярности в области E1 и цифра указывает долю гранулоцитов в образце крови (в %). Для расчёта ППН из значения E1 соответствующего Дк (цитограммы В и Д) вычитали значения E1 соответствующие показателю До (цитограммы А и С) и рассчитывали по формуле ППН для интактного (26,5–25,8/26,5=0,03) и иммунного (30,9–12,5/30,9=0,59) животного соответственно.

различий наглядно иллюстрируют цитограммы распределений лейкоцитов по размеру и степени гранулярности, представленные на рисунке. Так, в крови иммунизированного животного, более 50% гранулоцитов крови утрачивало к 4 ч инкубации *ex vivo* с Yp37 свою исходно высокую степень внутриклеточной гранулярности (цитограммы С и Д), что соответствовало значению ППН=0,59. В популяции гранулоцитов крови интактной морской свинки живые клетки Yp37 фактически не индуцировали к 4 ч таких деге-

неративных изменений (цитограммы А и В) и значение ППН=0,03.

Отсутствие антибактериального реагирования гранулоцитов крови интактных животных через 4 ч инкубации в пробах с Yp37 могут объяснить результаты недавних исследований Eichelberger et al. (2019) [18], в которых было установлено, что чумной микроб для создания благоприятной окружающей среды, способствующей выживанию и размножению в условиях *in vivo* (для подавления защитной воспалительной реакции макроорганиз-

ма), использует особую стратегию вирулентности, основанную на ингибировании в нейтрофилах организма хозяина процесса секреторной азурофильной дегрануляции посредством функционирования своей системы секреции III типа (Т3SS), а эффекторами её работы выступают Yop-белки – YopE и YopH, причём триггером к запуску продукции этих белков служит температура тела (37°C) теплокровного организма. Кроме того, повышение температуры до 37°C изменяет структуру липополисахарида (ЛПС) *Y. pestis*, в результате чего ЛПС утрачивает способность активировать TLR4 клетки врождённого иммунитета и не может индуцировать воспалительную реакцию. Для активации TLR4, как оказалось, необходим протеолитический эффект высвобождаемой из нейтрофилов ЛЭ, от которого зависит способность этого рецептора реагировать на ЛПС в условиях *in vivo* и *in vitro* [19].

Так как дегрануляция и лизис НГ необходимы для развития защитной воспалительной реакции [8,19,20], а также для запуска процесса деконденсации ядерного хроматина при нетозе [11], предполагают, что *Y. pestis* ингибирует дегрануляцию с целью «выключить» на ранней стадии чумной инфекции механизм аутолиза НГ (нетоз) [21], обеспечивающий при бактериемии высокую эффективность захвата и киллинга бактерий в потоке крови [12]. По-видимому, этот защитный механизм «включался» и функционировал в крови только иммунных животных, в присутствии активных при нетозе IgG к специфическим антигенам чумного микроба. Данные о значениях ППН у иммунизированных животных, полученные нами на модели чумной бактериемии *ex vivo*, согласуются с результатами исследований по изучению механизма внеклеточной цитотоксичности НГ (нетоза), эффективно предотвращающего микробную диссеминацию и сепсис при инфекциях, вызываемых условно-патогенными бактериями [12], и с нашими данными о роли вакцинации в реализации праймирующего эффекта на НГ биомодели, приводящего к активации процесса формирования ДНК-сетей NETs во внеклеточном пространстве [14].

Эффективность обнаружения поствакцинальной сенсibilизации у привитых морских свинок по показателю ППН снижалась, когда в качестве специфического антигена (аллергена) в экспериментах по моделированию бактериемии *ex vivo* использовали не Yp37, а Yp28. В этом случае мы регистрировали более низкие значения ППН для животных, иммунизированных вакцинным штаммом. Кроме того, клетки Yp28 оказывали более интенсивное повреждающее воздействие *ex vivo* на НГ крови интактных морских свинок (таб-

лица 1), что могло быть связано с праймирующим и цитотоксическим действием ЛПС [16,19], либо с активацией процесса фагоцитоза и, как следствие, с индуцированной фагоцитозом клеточной гибелью [22]. Ранее нами было замечено, что на модели бактериемии *ex vivo* клетки Yp28 в большей степени, чем Yp37, повышали плотность поверхностной экспрессии на гранулоцитах крови тирозиновой протеинфосфатазы (CD45), регулирующей сигнальную функцию FcγR при взаимодействии с иммунными комплексами [23].

По данным настоящей работы, в крови иммунизированных животных, вероятно, присутствовали активные при нетозе IgG антитела к секреторируемому во внеклеточное пространство антигенам *Y. pestis*, кодируемым плазмидой pCad (Yops-белкам), поскольку для животных, вакцинированных моноплазмидным штаммом KM217, значения ППН повышались *ex vivo* в ответ на Yp37, но не в ответ на убитые клетки DYp37. В настоящее время у вакцинного штамма *Y. pestis* EV выявлено 170 белков с потенциальными аллергенными свойствами, среди которых как антигены, относящиеся к группе экстрацеллюлярных белков, так и белки, входящие в состав наружной бактериальной мембраны [24]. По литературным данным, в сыворотках крови всех привитых против чумы морских свинок с положительными значениями ППН при использовании в качестве аллергена капсульного антигена (Ф1), синтез которого связан с плазмидой pFra [15], присутствовали на 21-е сутки иммуногенеза специфические IgG к Ф1 [3]. Вероятно, поэтому мы регистрировали максимальные значения ППН в опытах с Yp37 и наблюдали аналогичную картину в случае использования убитых клеток DYp37 (таблица 1). Наличие на поверхности НГ рецептора, выполняющего функцию сенсора размера микроорганизмов, позволяет этим клеткам дифференцировать отдельные мелкие бактерии от их агрегатов, образующихся в процессе агглютинации, чтобы «выбрать» соответствующий механизм бактерицидности (фагоцитоз – для отдельных мелких бактерий; или нетоз – для микробных агрегатов) [11]. Процесс агглютинации бактерий, являющийся триггером нетоза, возможно, активировался в крови иммунизированных животных в результате связывания IgG антител с Ф1 на клеточной поверхности, а также с антигенами, синтез которых кодируют в клетках *Y. pestis* гены плазмиды пестициногенности (pPst).

Важным моментом для определения эффективности метода определения ППН с использованием цитометрического анализа было выяснение существования зависимости величины этого по-

казателя от степени выраженности иммунологической перестройки в организме биомодели. Для морских свинок, иммунизированных изогенными вариантами вакцинного штамма, были зарегистрированы при моделировании специфической бактериемии в условиях *ex vivo* более низкие показатели ППН (таблица 1). Эти данные согласуются с результатами по оценке защитной эффективности вакцинного штамма и его изогенных производных, полученными ранее на модели бубонной чумы у морских свинок. Так, *Y. pestis* EV НИИЭГ (Pgm, pFra<sup>+</sup>, pCad<sup>+</sup>, pPst<sup>+</sup>) защищал на 21-е сутки иммуногенеза морских свинок от заражения чумой в 200 раз эффективнее трёх его изогенных производных (KM216, KM217 и KM218) [15], что являлось косвенным свидетельством зависимости результатов реакции НГ при моделировании специфической бактериемии в условиях *ex vivo* от интенсивности формируемого в организме иммунного ответа.

На основании вышеперечисленного было сделано заключение о возможности использования метода проточной цитометрии для определения ППН в опытах по характеристике эффективности специфического противочумного иммунитета у биомоделей а, возможно, и для оценки напряжённости противочумного иммунитета у людей.

Хотя ППН давно известен и значения ППН, определяемые с помощью микроскопии в опытах *in vitro* с некоторыми бактериальными аллергенами, коррелируют с интенсивностью кожной аллергической реакции [10], данный показатель в качестве альтернативы кожной пробе в настоящее время не применяется при оценке противочумного иммунитета у людей и животных.

Возможно, это обусловлено рядом методических погрешностей. Например, по мнению разработчика теста ППН В.А. Фрадкина [10], значительные разбросы величин показателя при повторных исследованиях и малозаметная разница в степени цитолиза клеток (нейтрофилов) у высокосенсибилизированных и контрольных лиц кроются в методологии учёта теста *in vitro*, когда оценивается разница в

числе лейкоцитов в опытных и контрольных образцах крови, а необходимо учитывать частоту развития дегенеративных изменений в цитоплазме и ядре клеток в аналогичных условиях. Это и осложняет использование классического варианта постановки теста ППН, основанного на результатах субъективного микроскопического анализа. Вторым методическим моментом стал временной интервал для проведения учёта результатов теста. Так, если в классической кожной пробе на пестин наиболее интенсивная реакция развивалась через 6-7 ч с постепенным снижением реактивности к 72 ч [1], то в тестах ППН *in vitro* результат учитывали в первые 2 ч [3,10], когда ещё не могла быть выявлена заметная разница в цитолизе нейтрофилов, а формировались лишь начальные дегенеративные изменения, предшествующие нетозу. Аутолизис НГ с высвобождением из этих клеток ЛЭ регистрируется у людей при кожных аллергических реакциях не ранее 4 ч, в то время как через 1-2 ч в кожных пробах отмечается только повышение концентрации гистамина [7], обычно высвобождаемого при IgE-обусловленных аллергиях [6,20]. Именно этими соображениями мы руководствовались при определении периода инкубации проб при моделировании бактериемии *ex vivo*.

Ещё один важный методический момент проведения исследования был связан с применением в настоящей работе Lyse/No-Wash протокола пробоподготовки материала, что позволяло полностью исключать любые возможные клеточные потери и обеспечивало максимальную степень стандартизации при учёте результатов количественного цитометрического анализа [17].

Таким образом, в результате проведённых сравнительных исследований реакции гранулоцитов крови предварительно иммунизированных *Y. pestis* EV НИИЭГ и интактных морских свинок в условиях моделирования чумной бактериемии *ex vivo* были отработаны методические параметры проведения и учёта реакции ППН для оценки эффективности защиты биомодели.

**Таблица 1. Результаты цитометрической оценки показателя повреждения нейтрофилов крови у иммунизированных и интактных морских свинок в экспериментах *ex vivo***

Иммунизирующая культура	Показатель повреждения нейтрофилов			
	Yp28	DYp28	Yp37	DYp37
<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ	0,36* (0,27–0,45)	0,25* (0,17–0,31)	0,47* (0,31–0,58)	0,44* (0,38–0,53)
<i>Y. pestis</i> KM216	0,28* (0,22–0,36)	0,16 (0,08–0,26)	0,22* (0,14–0,28)	0,15* (0,10–0,21)
<i>Y. pestis</i> KM217	0,11 (0,07–0,16)	0,09 (0,03–0,13)	0,16* (0,13–0,20)	0,05 (0,02–0,07)
<i>Y. pestis</i> KM218	0,12 (0,10–0,15)	0,14 (0,11–0,16)	0,08 (0,04–0,13)	0,06 (0,03–0,10)
–	0,16 (0,08–0,21)	0,13 (0,11–0,15)	0,05 (0,02–0,09)	0,04 (0,02–0,08)

Примечание: \* p<0,05 – достоверность различий между иммунизированными и интактными животными.

## Заключение

Путём сравнительного цитометрического анализа установлена способность гранулоцитов крови предварительно иммунизированных *Y. pestis* EV НИИЭГ морских свинок, в отличие от гранулоцитов интактных животных, отвечать интенсивной дегрануляцией и лизисом на повторный контакт с живыми клетками чумного микроба при моде-

лировании бактериемии *ex vivo*. Регистрируемые методом проточной цитометрии значения ППН могут быть использованы для сравнительной характеристики эффективности разрабатываемых противочумных вакцин и/или схем их применения на доклиническом этапе исследования, а, возможно, и для оценки напряжённости поствакцинального противочумного иммунитета у людей.

## Литература

1. Коробкова Е.И. Кожная аллергическая реакция как показатель иммунитета при чуме. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1955;4:40-47.
2. Богачева Н.В., Крючков А.В., Дармов И.В., и др. Экспериментальная оценка методом проточной цитофлуориметрии уровня клеточной иммунологической памяти у лиц, вакцинированных против чумы и сибирской язвы. Клиническая лабораторная диагностика. 2013;11:48-53.
3. Белов Л.Г., Маторина Н.А., Дробышева Т.М. К вопросу о диагностике гиперчувствительности немедленного и замедленного типов по тесту ППН у морских свинок. Патологическая физиология, иммунология и аллергология особо опасных инфекций. 1984;18-21.
4. Гостищева С.Е., Абзаева Н.В., Ковалев Д.А., и др. Оптимизация метода получения пестина ПП и изучение его специфической активности *in vitro*. Инфекция и иммунитет. 2018;8(1):85-90. doi:10.15789/2220-7619-2018-1-85-90.
5. Granger V, Peyneau M, Chollet-Martin S, et al. Neutrophil extracellular traps in autoimmunity and allergy: immune complexes at work. Front. Immunology. 2019;10:2824. doi:10.3389/fimmu.2019.02824.
6. Jönsson F, Mancardi DA, Kita Y, et al. Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis. J Clin Invest. 2011;121(4):1484-1496. doi:10.1172/JCI145232.
7. Zwaiman B, Kuceich U, Shalit M, et al. Release of lactoferrin and elastase in human allergic skin reactions. J. Immunology. 1990;144(10):3953-3960. doi:10.4049/jimmunol.144.10.3953.
8. Zeng W, Song Y, Wang R, et al. Neutrophil elastase: From mechanisms to therapeutic potential. J. Pharm. Analysis. 2023;13(4):335-366. doi:10.1016/j.jpha.2022.12.003.
9. Won DI, Kim S, Lee EH. Neutrophil oxidative burst as a diagnostic indicator of IgG-mediated anaphylaxis. Blood Res. 2018;53(4):299-306. doi:10.5045/br.2018.53.4.299.
10. Фрадкин В.А. Диагностика аллергии реакциями нейтрофилов крови. М: Медицина, 1985; 175 с.
11. Branzk N, Lubojemska A, Hardison SE, et al. Neutrophil sense microbial size and selectively release neutrophil extracellular traps in response large pathogens. Nat. Immunology. 2014;15(11):1017-1025. doi:10.1038/ni.2987.
12. McDonald B, Urrutia R, Yipp BG, et al. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from bloodstream during sepsis. Cell Host Microbe. 2012;12(3):324-333. doi:10.1016/j.chom.2012.06.011.
13. Rosales C, Uribe-Querol E. Neutrophil activation by antibody receptors. In book: Neutrophils. Ed. Khajah M. London: Intechopen limited, 2019, 85 p. doi:10.5772/intechopen.80666.
14. Кравцов А.Л., Гончарова А.Ю., Бугоркова С.А., и др. Формирование нейтрофильных внеклеточных ловушек при моделировании чумной инфекции у мышей, иммунизированных *Yersinia pestis* EV НИИЭГ. Проблемы особо опасных инфекций. 2020;4:70-74. doi:10.21055/0370-1069-2020-4-70-74.
15. Анисимова Т.И., Саяпина Л.В., Ледванов М.Ю., и др. Усовершенствование требований к неклиническим испытаниям штаммов чумного микроба, перспективных в качестве вакцинных. Биопрепараты. 2003;3(11):9-12.
16. Landoni VI, Chiarella P, Martire-Greco D, et al. 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. doi:10.1111/j.1365-2249.2012.04560.x.
17. Vera EJ, Chew YV, Nicholson L, et al. Standardization of flow cytometry for whole blood immunophenotyping of islet transplant and transplant clinical trial recipients. PLoS One. 2019;14(5):e0217163. doi:10.1371/journal.pone.0217163.
18. Eichelberger KR, Jones GS, Goldman WE. Inhibition of neutrophil primary granule release during *Yersinia pestis* pulmonary infection. mBio. 2019;10(6):e02759-19. doi:10.1128/mBio.02759-19.
19. Tang AH, Brunn GJ, Cascalho M, et al. Pivotal advance: endogenous pathway to SIRS, sepsis and related conditions. J. Leukoc. Biology. 2007;82(2):282-285. doi:10.1189/jlb.1206752.
20. Vitte J, Vibhushan S, Bratti M, et al. Allergy, anaphylaxis, and nonallergic hypersensitivity: IgE, mast cells, end beyond. Med. Princ. Pract. 2023;31(6):501-515. doi:10.1159/000527481.
21. Stasulli NM, Eichelberger KR, Price PA, et al. Spatially distinct neutrophil responses within the inflammatory lesions of pneumonic plague. mBio. 2015;6(5):e01530-15. doi:10.1128/mBio.01530-15.
22. Spinner JL, Seo KS, O'Loughlin JL, et al. Neutrophil are resistant to *Yersinia YopJ/P*-induced apoptosis and are protected from ROS-mediated cell death by type III secretion system. PLoS ONE. 2010;5(2):e 9279. doi:10.1371/journal.pone.0009279.
23. Кравцов А.Л., Ключева С.Н., Кожевников В.А., и др. Повышение экспрессии тирозиновой протеинфосфатазы (CD45) на поверхности гранулоцитов крови человека под влиянием вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ *ex vivo* и *in vivo*. Медицинская иммунология. 2024;26(1):135-142. doi:10.15789/1563-0625-IEO-2649.
24. Сулягин В.В., Ковалева Г.Г. Белки вакцинного штамма чумного микроба (*Yersinia pestis* EV НИИЭГ) с потенциальными свойствами аллергенов. Проблемы особо опасных инфекций. 2019;4:97-101. doi:10.21055/0370-1069-2019-4-97-101.

## Сведения об авторах

Кравцов Александр Леонидович – д.б.н., ведущий научный сотрудник отдела иммунологии. E-mail: kravzov195723@gmail.com. ORCID: 0000-0002-9016-6578.  
 Гончарова Анастасия Юрьевна – к.м.н., научный сотрудник отдела иммунологии. E-mail: rusrapi@microbe.ru. ORCID: 0000-0002-9994-7936.  
 Ключева Светлана Николаевна – к.б.н., научный сотрудник отдела иммунологии. E-mail: klyueva.cvetlana@mail.ru. ORCID: 0000-0002-5550-6063.  
 Бугоркова Светлана Александровна – д.м.н., главный научный сотрудник отдела иммунологии. E-mail: rusrapi@microbe.ru. ORCID: 0000-0001-7548-4845.

Поступила 24.03.2024.