

## ПОВЫШЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ТИРОЗИНОВОЙ ПРОТЕИНФОСФАТАЗЫ (CD45) НА ПОВЕРХНОСТИ ГРАНУЛОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПОД ВЛИЯНИЕМ ВАКЦИННОГО ШТАММА *YERSINIA PESTIS* EV НИИЭГ *EX VIVO* И *IN VIVO*

Кравцов А.Л., Ключева С.Н., Кожевников В.А., Бугоркова С.А.

ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт “Микроб”», г. Саратов, Россия

**Резюме.** Тирозиновая протеинфосфатаза (общий лейкоцитарный антиген CD45) регулирует FcγR-опосредованную передачу клеточных сигналов и секреторную функцию нейтрофильных гранулоцитов (НГ) при взаимодействии с иммунными комплексами антиген-антитело. Цель работы — изучить изменения в экспрессии CD45 на поверхности гранулоцитов крови человека при моделировании бактериемии *ex vivo* живыми клетками вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ и оценить праймирующий эффект вакцины чумной живой (ВЧЖ) в условиях *in vivo* по данному показателю. Плотность экспрессии CD45 на НГ определяли методом проточной цитометрии в условных единицах интенсивности флуоресценции (MFI) после окраски клеток реагентом меченых мышинных антител CD45-FITC (Beckman Coulter, США) при иммунофенотипировании лейкоцитов крови по Lyse/No Wash протоколу. У ранее не прививавшихся против чумы доноров (группа 1) значение показателя оценивали до и через 30 мин, 2 ч, 6 ч после добавления в цельную кровь клеток *Y. pestis* EV в дозе  $10^8$  мк/мл, а также через 1 и 6 месяцев после противочумной вакцинации. У лиц, ранее неоднократно прививавшихся ВЧЖ по эпидемиологическим показаниям (группа 2), экспрессию CD45 на гранулоцитах крови определяли перед очередной прививкой и через 1, 6 месяцев спустя. Попадая в кровь человека, живые клетки вакцинного штамма *Y. pestis* EV уже через 30 мин индуцировали изменение фенотипа НГ, связанное с повышением в 3,5 раза поверхностной экспрессии CD45, которое сохранялось на достигнутом уровне в течение 6 ч. Интенсивность функциональной активации клеток врожденного иммунитета по исследуемому показателю в опытах *ex vivo* зависела от степени устойчивости чумного микроба к фагоцитозу и киллингу НГ. *In vivo* аналогичный стимулирующий эффект на НГ периферической крови человека оказывала противочумная вакцинация. Под влиянием ВЧЖ экспрессия CD45 повышалась на НГ крови в группах 1 и 2 через месяц после прививки и изменения сохранялись у добровольцев в течение 6 месяцев. Полученные в работе экспериментальные данные могут отражать результат прайминга НГ липополисахаридом и другими антигенами *Y. pestis*. Зарегистрированная функциональная активация

### Адрес для переписки:

Ключева Светлана Николаевна  
ФКУН «Российский научно-исследовательский  
противочумный институт “Микроб”»  
410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, 46.  
Тел.: 8 (987) 830-50-75.  
E-mail: klyueva.cvetlana@mail.ru

### Address for correspondence:

Svetlana N. Klyueva  
Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”  
46 Universitetskaya St  
Saratov  
410005 Russian Federation  
Phone: +7 (987) 830-50-75.  
E-mail: klyueva.cvetlana@mail.ru

### Образец цитирования:

А.Л. Кравцов, С.Н. Ключева, В.А. Кожевников,  
С.А. Бугоркова «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. Т. 26, № 1.  
С. 135-142. doi: 10.15789/1563-0625-IEO-2649  
© Кравцов А.Л. и соавт., 2024  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### For citation:

A.L. Kravtsov, S.N. Klyueva, V.A. Kozhevnikov,  
S.A. Bugorkova “Increased expression of tyrosine protein  
phosphatase (CD45) on the surface of human blood  
granulocytes under the influence of the plague microbe vaccine  
strain *Yersinia pestis* EV NIEG *ex vivo* and *in vivo*”, *Medical  
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024,  
Vol. 26, no. 1, pp. 135-142.  
doi: 10.15789/1563-0625-IEO-2649  
© Kravtsov A.L. et al., 2024  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License  
DOI: 10.15789/1563-0625-IEO-2649

НГ по экспрессии тирозиновой протеинфосфатазы, вероятно, свидетельствует о формировании под влиянием ВЧЖ «иммунной памяти» на уровне рецепторов клеток врожденного иммунитета, функционированием которой объясняют развитие более быстрого и интенсивного антигенспецифического иммунного ответа на повторное введение в организм чумной вакцины.

**Ключевые слова:** вакцинный штамм *Yersinia pestis* EV НИИЭГ, тирозиновая протеинфосфатаза CD45, противочумная вакцинация, экспрессия CD45 нейтрофилами, проточная цитометрия

## INCREASED EXPRESSION OF TYROSINE PROTEIN PHOSPHATASE (CD45) ON THE SURFACE OF HUMAN BLOOD GRANULOCYTES UNDER THE INFLUENCE OF THE PLAGUE MICROBE VACCINE STRAIN *YERSINIA PESTIS* EV NIIEG *EX VIVO* AND *IN VIVO*

Kravtsov A.L., Klyueva S.N., Kozhevnikov V.A., Bugorkova S.A.

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

**Abstract.** Tyrosine protein phosphatase (common leukocyte antigen CD45) regulates FcγR-mediated cell signaling and secretory function of neutrophilic granulocytes (NG) when interacting with antigen-antibody immune complexes. The aim of present work was to study changes in CD45 expression on the surface of human granulocytes in *ex vivo* modeling of bacteremia by live cells of the plague microbe vaccine strain *Yersinia pestis* EV NIIEG, and to evaluate the priming *in vivo* effect of the live plague vaccine (LPV) in terms of this parameter. The expression density of CD45 on NG was determined by flow cytometry as arbitrary units of fluorescence intensity (MFI) after staining the cells with the CD45-FITC labeled murine antibody reagent (Beckman Coulter, USA) upon immunophenotyping of blood leukocytes according to the Lyse/No Wash protocol. This index in blood donors previously not vaccinated against plague (group 1) was quantitatively assessed before and at different terms (30 min, 2 h, 6 h) after the addition of *Y. pestis* EV cells to whole blood at a dose of  $10^8$  mc/mL, as well as 1 month and 6 months after the primary anti-plague vaccination. In the individuals previously repeatedly vaccinated with LPV by epidemiological reasons (group 2), CD45 expression was studied on blood granulocytes one year after the last annual vaccination, and then 1 month and 6 months after revaccination. Upon incubation with human blood, the living cells of the *Y. pestis* EV vaccine strain induced a change in the NC phenotype already after 30 minutes, associated with a 3.5-fold increase in the surface expression of CD45, which remained at an elevated level for 6 hours. The studied index depended *ex vivo* on the degree of resistance of plague microbes to phagocytosis and killing of NG. Plague vaccination had a similar stimulating effect on human peripheral blood NG *in vivo*. Under the influence of live plague vaccine, an increased CD45 expression on blood NG in groups 1 and 2 was detected one month after vaccination, and these changes persisted in volunteers for 6 months. The experimental data obtained in this study may reflect the result of NG priming with lipopolysaccharide and other *Y. pestis* antigens. The registered functional activation of NG by expression of tyrosine protein phosphatase probably suggests the formation of "immune memory" at the level of innate immunity cells under the influence of live plague vaccine. Such effect explains the development of faster and more intense antigen-specific immune response to repeated introduction of the plague vaccine into the body.

**Keywords:** *Yersinia pestis* EV NIIEG, vaccine strain, tyrosine protein phosphatase CD45, anti-plague vaccination, CD45 expression, neutrophils, flow cytometry

### Введение

В настоящее время актуальной проблемой медицинской иммунологии является разработка экспериментальной методической основы для оценки напряженности приобретенного противoinфекционного клеточного иммунитета у

людей, базирующейся на использовании современных достижений в области автоматизации цитологических исследований [1]. Успешное решение этой проблемы при совершенствовании схем противочумной вакцинации и ревакцинации требует детального изучения сложных молекулярных механизмов формирования адаптивно-

го иммунитета, связанных с функционированием не только Т- и В-лимфоцитов памяти, но и «иммунной памяти», проявляемой на уровне рецепторов клеток врожденного иммунитета. От «иммунной памяти» зависит, как в последние годы было установлено, развитие более быстрого и интенсивного антигенспецифического иммунного ответа на повторное введение в организм живой чумной вакцины [2].

Первыми на внедрение в организм *Y. pestis* отвечают, как известно, нейтрофильные гранулоциты (НГ) [14], которые в свете современных представлений являются главенствующими клетками противобактериальной защиты, наделенными уникальными возможностями активации и регуляции иммунного ответа [5, 12]. Для этих клеток известны два отчетливо различимых функциональных состояния: исходное, так называемое «gedox», с низким уровнем протекания процессов, и активированное, переход в которое обусловлен взаимодействием с различными стимуляторами. Увеличение функционального потенциала НГ при предварительном воздействии стимулов, в том числе бактерий, бактериальных антигенов (например, липополисахаридов — ЛПС) и/или аллергенов называют праймингом (priming — подготовка, перевод клеток в рабочее состояние) [6, 10].

При прайминге на поверхности НГ повышается плотность экспрессии Fc-рецепторов, при взаимодействии с которыми молекулы специфических антител (IgG) в составе иммунных комплексов антиген-антитело стимулируют бактерицидную функцию НГ при киллинге бактерий [13], а также секреторную функцию этих клеток с высвобождением медиаторов воспаления (IL-6 и лейкоцитарных протеаз) при альтернативных IgG-обусловленных адаптивных аллергических и анафилактических реакциях [12], развивающихся без участия IgE, тучных клеток и базофилов [9]. Установлено, что FcγR-опосредованную передачу клеточных сигналов при функциональной активации НГ регулирует тирозиновая протеинфосфатаза (ТПФ), роль которой в определении исхода взаимодействия иммунных комплексов с клетками врожденного иммунитета недостаточно изучена. Этот гликопротеин (CD45), выполняющий свою сигнальную функцию внутри активированных лейкоцитов, часто называют общим лейкоцитарным антигеном [8, 11].

**Цель исследования** — изучить изменения в экспрессии ТПФ на гранулоцитах крови человека при моделировании бактериемии *ex vivo* живыми клетками вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ и оценить праймирующий эффект живой чумной вакцины по данному показателю в условиях *in vivo*.

## Материалы и методы

В исследованиях использовали вакцинный штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ из «Государственной коллекции патогенных бактерий (ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб»». Двухсуточную стационарную культуру *Y. pestis* выращивали на агаре Хоттингера (рН 7,2) при 28 °С (Yp28). Экспоненциальную 18-часовую бактериальную культуру с измененными антигенными свойствами получали путем выращивания с аэрацией на бульоне Хоттингера (рН 7,2) при 37 °С (Yp37). В стерильном фосфатно-солевом буфере (рН 7,4) с 0,9% NaCl (ФСБ) готовили по стандартному образцу мутности ОСО 42-28-59-85П из культур Yp28 и Yp37 взвеси живых бактерий с концентрацией 10<sup>9</sup> мк/мл. На 1 мл цельной крови человека добавляли 100 мкл миллиардной взвеси (10<sup>8</sup> бактерий), что соответствовало в среднем микробной нагрузке в крови около 50 мк на фагоцит. Изменения в уровне экспрессии CD45 на поверхности НГ в условиях моделирования бактериемии *ex vivo* живыми клетками Yp28 и Yp37 регистрировали через 30 мин, 2 и 6 ч инкубации крови при 37 °С. Контролем служили результаты анализа крови тех же доноров без добавления бактерий.

Кровь забирали из локтевой вены в пробирки с антикоагулянтом (гепарином) в количестве от 10 до 20 мл и использовали в течение 1-2 ч после выделения. Исследовали образцы крови 10 условно здоровых доноров (4 мужчин и 6 женщин) возрастом от 23 до 50 лет, не прививавшихся ранее против чумы и не проживающих на территориях природных очагов чумы Российской Федерации (группа 1). У лиц данной группы экспрессию CD45 на поверхности НГ оценивали в крови до и в процессе взаимодействия *ex vivo* с клетками живой чумной вакцины (ВЧЖ), спустя 1 и 6 месяцев после вакцинации. Кроме того, объектом исследования была кровь 20 доноров возрастом от 28 до 60 лет, проживающих на территории Прикаспийского песчаного природного очага чумы (группа 2), которые ранее неоднократно (от 2 до 30 раз) по эпидемическим показаниям были привиты ВЧЖ. Экспрессию CD45 на НГ крови лиц из группы 2 определяли перед очередной вакцинацией (через год после последней прививки) и спустя 1 и 6 месяцев. У всех участников исследования забор крови проводили на основании должным образом оформленного добровольного информированного согласия.

В работе использовали ВЧЖ производства ФКУЗ Ставропольского НИПЧИ (серия № 1-15, 12.03.2015-12.03.2018), представляющую собой лиофилизированную живую культуру вакцинного штамма чумного микроба *Y. pestis* EV НИИЭГ со стабилизатором. Вакцинацию проводили на-

кожным способом дозой  $3 \times 10^9$  микробных клеток в соответствии с инструкцией по применению препарата.

Плотность экспрессии CD45 на поверхности НГ крови человека оценивали методом проточной цитофлуориметрии в условных единицах интенсивности флуоресценции (MFI) на цитометре DakoCytomation (Дания) с программным обеспечением Summit v. 4.3 Built 2445. Лейкоциты в исследуемых образцах цельной крови окрашивали мечеными мышиными моноклональными антителами CD45-FITC (Beckman Coulter, США) согласно Lyse/No Wash протоколу иммунофенотипирования фирмы BD Bioscience (США), обеспечивающему высокую степень стандартизации результатов клинических цитологических исследований [15]. Гранулоциты дифференцировали от других экспрессирующих CD45 клеток крови (лимфоцитов и моноцитов) по интенсивности бокового светорассеяния, зависящей от степени их внутриклеточной гранулярности [3].

Для статистической обработки экспериментальных данных использовали Microsoft Excel 2016 и Statistica 10.0 (StatSoft Inc.). Результаты представляли в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ ) с расчетом достоверности различий в исследуемых группах с использованием U-критерия Манна-Уитни. Различия групп полагали статистически значимым при значениях  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Попадая в кровь человека, живые клетки вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ уже че-

рез 30 мин индуцировали изменение фенотипа НГ, связанное с существенным повышением плотности поверхностной экспрессии на фагоцитах ТПФ (CD45), которое наглядно иллюстрируют цито-и гистограммы, представленные на рисунке 1. Повышенная плотность экспрессии ТПФ сохранялась на НГ, взаимодействующих с чумным микробом в условиях *ex vivo*, в течение 6 ч инкубации и интенсивность изменений по данному показателю зависела от условий выращивания бактериальной культуры (табл. 1), определяющих различия в антигенных и антифагоцитарных свойствах клеток Yp28 и Yp37.

В ответ на клетки Yp28, более чувствительные к фагоцитозу и киллингу НГ [14], в наших исследованиях были зарегистрированы более интенсивные изменения по экспрессии ТПФ, что согласуется с литературными данными об активном участии CD45 в регуляции функции рецепторов НГ, ответственных за распознавание патогенных микроорганизмов [8, 11]. Более интенсивное воздействие Yp28 на регулятор и модулятор функции рецепторов клеток врожденного иммунитета связано, вероятно, с праймирующим эффектом ЛПС Yp28, который стимулирует врожденную иммунную систему организма хозяина, как известно, эффективнее ЛПС Yp37 [14], а также с особенностями структуры и морфологии бактерий, распознаваемыми рецепторами НГ [7]. От состояния рецепторного аппарата НГ, молниеносно реагирующего на сдвиги в иммунном гомеостазе, зависит эффективность функционирования механизмов бактерицидности, используемых самой многочисленной и мобильной популяцией клеток врожденного иммунитета при выборе стра-

**ТАБЛИЦА 1. ПОВЫШЕНИЕ ПЛОТНОСТИ ЭКСПРЕССИИ CD45 НА НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТАХ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С КЛЕТКАМИ *Y. PESTIS* EV НИИЭГ *EX VIVO* (ГРУППА 1), Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )**

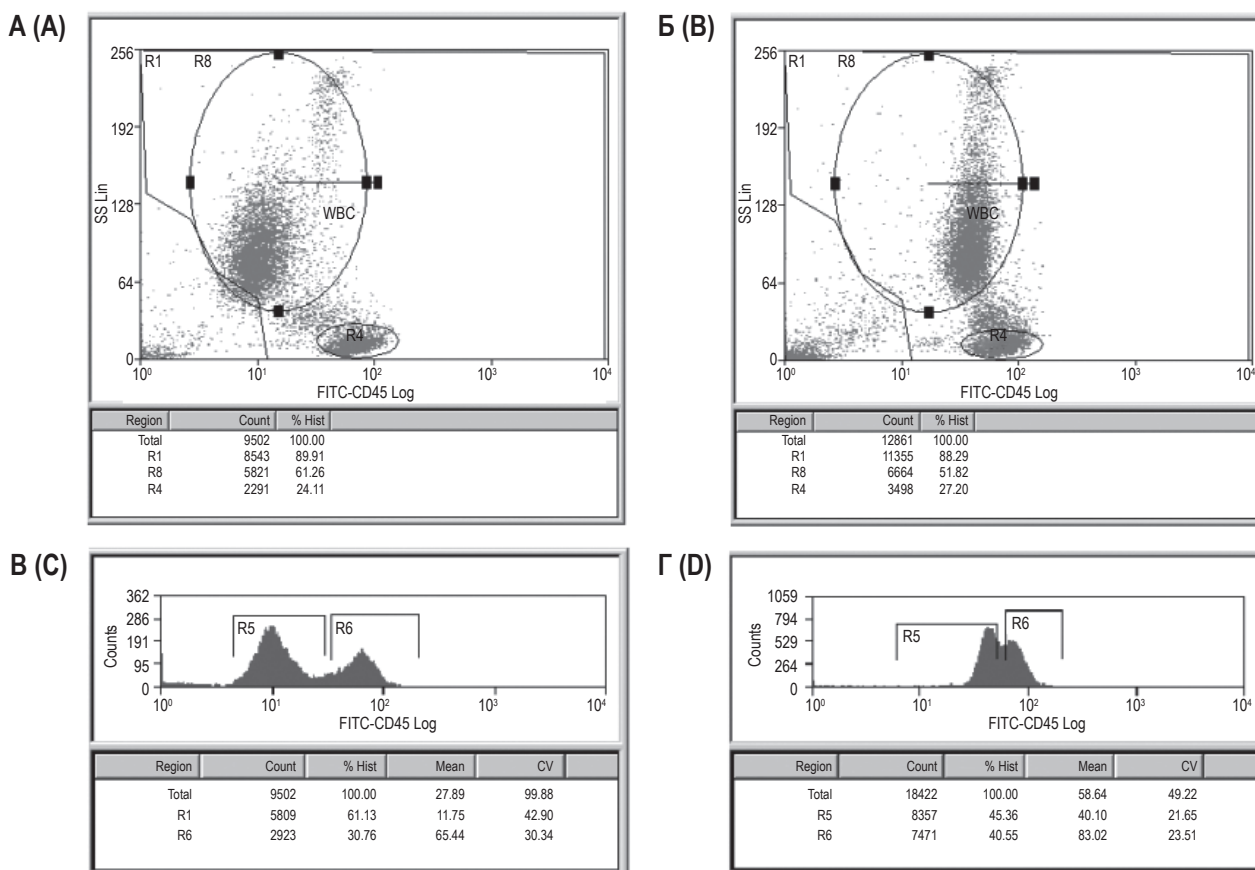
TABLE 1. INCREASE IN CD45 EXPRESSION DENSITY ON HUMAN BLOOD NEUTROPHIL GRANULOCYTES UPON INTERACTION WITH LIVING CELLS OF *Y. PESTIS* EV *EX VIVO* (GROUP 1), Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )

Образцы крови Blood samples	Плотность экспрессии CD45 (у. е.) в различные сроки инкубации CD45 expression density (c. u.) at different incubation times			
	0 мин 0 min	30 мин 30 min	120 мин 120 min	360 мин 360 min
Без бактерий (контроль) Without bacteria (control)	12,8 (11,8-14,8)	16,7 (14,1-18,3)	18,3 (14,9-20,2)	20,7 (18,9-21,8)
с Yp28 with Yp28	—	42,8 (41,3-45,6)***	42,4 (40,2-43,7)***	40,3 (39,2-42,2)***
с Yp37 with Yp37	—	28,5 (27,8-33,7)*	34,7 (32,7-36,1)*	30,0 (28,8-31,2)*

Примечание. \* – достоверность различий с контролем; \*\* – достоверность различий в опытах с Yp28 и Yp37.

Note. \*, significance of differences with control; \*\*, significance of differences in experiments with Yp28 and Yp37.





**Рисунок 1. Функциональная активация гранулоцитов по маркеру CD45 в крови с добавлением живых микробных клеток вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ**

**Примечание.** На цитограммах (сверху, Б – опыт через 30 мин, А – контроль) гранулоциты крови (нейтрофилы) локализируются в регионе R8, отделяясь от лимфоцитов (регион R4) и моноцитов по интенсивности бокового светорассеяния (степени своей гранулярности – SS). Вне региона R1 на цитограммах учитывались сигналы от клеточного дебриса (лизированных лейкоцитов). Под каждой цитогграммой представлено соответствующее частотное распределение отдельных лейкоцитов по плотности экспрессии на клетку CD45. Гистограммы В и Г получены без гейтирования по региону R8, чтобы показать выраженные различия (в 5,6 раза) по экспрессии CD45, характерные в норме (контрольная гистограмма С) для гранулоцитов (пик слева в регионе R5, Mean 11,75) и лимфоцитов (пик справа в регионе R6, Mean 65,44). В присутствии чумных микробов экспрессия CD45 на НГ повышалась до 40,1 у. е. (R5 Mean на гистограмме Д).

Figure 1. Functional activation of granulocytes by the marker CD45 in blood contaminated with cells of plague microbe vaccine strain *Y. pestis* EV NIIEG

**Note.** On cytograms (top, B, experiment after 30 min; A, control) blood granulocytes (neutrophils) are localized in the R8 region, separating from lymphocytes (R4 region) and monocytes according to the intensity of side light scattering (the degree of their granularity – SS). Outside the R1 region on cytograms, signals from cell debris (lysed leukocytes) were taken into account. Under each cytogram, the corresponding frequency distribution of individual leukocytes by expression density per CD45 cell is presented. Histograms C and D were obtained without gating in the R8 region to show pronounced differences (5.6 times) in CD45 expression, characteristic of normal (control histogram C) for granulocytes (peak on the left in the R5 region, Mean 11.7) and lymphocytes (peak on the right in region R6, Mean 65.44). In the presence of plague microbes, CD45 expression on neutrophilic granulocytes increased to 40.1 conventional units (R5 Mean on D histogram).

тегии обезвреживания опсонизированных бактерий: внутриклеточный киллинг (при фагоцитозе) и/или внеклеточный киллинг – секреторная дегрануляция и нетоз [7, 12, 13]. Установлено, что ЛПС грамотрицательных бактерий запускает при прайминге в условиях *in vivo* (при длительном внутривенном введении малых доз) перестройку рецепторного аппарата НГ периферической крови, которая при повторном контакте организма с инфекционным агентом способствует быстрому

«включению» дополнительного механизма внеклеточной бактерицидности (аутолизис НГ – нетоз), существенно повышающего эффективность киллинга бактерий [10].

В исследованиях на лабораторных животных ранее нами было установлено, что такой стимулирующий эффект на бактерицидную функцию НГ оказывает не только ЛПС, но и противочумная иммунизация с использованием вакцинного штамма *Y. pestis*, выращенного при 28 °C [4].

Учитывая, что молекулярным триггером нето-за в организме человека является рецептор НГ FcγRIIb(CD16) [13], был проведен сравнитель-ный анализ экспрессии CD16 на НГ крови при-витых и не привитых против чумы людей. Резуль-таты анализа выявили влияние противочумной вакцинации на плотность экспрессии CD16, особенно при повторном контакте НГ крови че-ловека со специфическим антигеном (аллерге-ном чумного микроба — пестином) [3]. Причем

сдвиги по экспрессии FcγRIIb соответствовали в этом случае сдвигам, характерным, по литерату-рым данным, для развития IgG-обусловленной анафилактики [9].

В настоящей работе впервые получены экс-периментальные данные о плотности экспрессии ТПФ на поверхности гранулоцитов крови приви-тых против чумы людей, которые представлены в таблице 2 в виде индивидуальных значений это-го показателя у лиц двух исследуемых групп до и

**ТАБЛИЦА 2. ИНДИВИДУАЛЬНЫЕ И СТАТИСТИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЭКСПРЕССИИ CD45 НА ГРАНУЛОЦИТАХ КРОВИ ОБСЛЕДУЕМЫХ ДОНОРОВ ДО И ПОСЛЕ ПРОТИВОЧУМНОЙ ВАКЦИНАЦИИ**

TABLE 2. INDIVIDUAL AND STATISTICAL INDICATORS OF THE EXAMINED DONOR BLOOD NEUTROPHIL CD45 EXPRESSION BEFORE AND AFTER ANTI-PLAGUE VACCINATION

№ донора в группе Donor № in the group	Плотность экспрессии CD45 (у. е.) на нейтрофилах крови донора CD45 Expression density (c. u.) on donor blood neutrophils		
<b>Группа 1</b> Group 1 (n = 5)	<b>До вакцинации</b> Before vaccination	<b>Через 1 месяц</b> 1 month after	<b>Через 6 месяцев</b> 6 months after
1	11,8	24,7 (+12,9)	23,0 (+11,2)
2	14,2	30,6 (+16,4)	26,6 (+12,4)
3	13,5	22,6 (+9,1)	20,5 (+7,0)
4	12,2	25,4 (+13,2)	27,0 (+15,7)
5	11,3	23,3 (+12,0)	20,6 (+9,3)
<b>Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)</b> Me (Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> )	12,2 (11,8-13,5)*	24,7 (23,3-25,4)**	23,0 (20,6-26,6)**
<b>Группа 2</b> Group 2 (n = 20)	<b>До вакцинации</b> Before vaccination	<b>Через 1 месяц</b> 1 month after	<b>Через 6 месяцев</b> 6 months after
1	21,2	23,4 (+2,2)	29,4 (+8,2)
2	21,5	24,9 (+3,4)	24,0 (+2,5)
3	21,7	30,4 (+8,4)	33,5 (+11,5)
4	15,8	24,5 (+9,7)	24,6 (+9,6)
5	16,2	26,5 (+10,3)	25,3 (+9,3)
6	21,5	29,8 (+8,3)	27,4 (+5,9)
7	19,5	23,5 (+4,0)	20,5 (+1,0)
8	19,2	31,8 (+12,6)	28,7 (+9,5)
9	22,2	29,3 (+7,1)	26,2 (+4,0)
10	20,6	27,6 (+7,0)	20,5 (0)
11	21,8	33,5 (+11,7)	26,4 (+4,6)
12	21,0	31,0 (+10,0)	22,0 (+1,0)
13	21,5	21,8 (+0,3)	29,6 (+8,1)
14	27,0	27,0 (0)	22,0 (-5,0)
15	20,6	20,4 (-0,2)	23,4 (+3,4)
16	21,0	27,4 (+6,4)	21,5 (+0,5)
17	16,7	29,0 (+12,3)	22,6 (+5,9)
18	19,7	29,1 (+9,4)	21,6 (+1,9)
19	18,5	26,5 (+8,0)	26,3 (+7,8)
20	15,6	19,5 (+4,0)	9,4 (+3,8)
<b>Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)</b> Me (Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> )	20,8 (18,8-21,5)*	27,2 (24,0-29,5)**	24,3 (21,8-26,9)**

Примечание. (+/-) – положительная/отрицательная разница значений до и после вакцинации; \* – достоверность различий между группами 1 и 2; \*\* – достоверность различий с показателем до вакцинации.

Note. (+/-), positive / negative difference between values before and after vaccination; \*, significance of differences between groups 1 and 2; \*\*, significance of differences between values before and after vaccination.

после противочумной вакцинации. Анализ этих данных свидетельствует, что перестройку рецепторного аппарата НГ с повышением плотности экспрессии регулятора функции Fc-рецепторов фагоцитов крови человека вызывает не только контакт с живыми клетками чумного микроба в условиях *ex vivo*, но и взаимодействие с ВЧЖ в процессе иммуногенеза *in vivo*.

Экспрессия CD45 на НГ крови всех доноров из группы 1 через месяц после вакцинации была вдвое выше нормы и сохранялась на том же уровне до 6 месяцев. Более того, из сравнения исходных показателей до вакцинации среди добровольцев из группы 1 и группы 2 следует, что повышенное значение плотности экспрессии ТПФ на гранулоцитах периферической крови может сохраняться у подавляющего большинства привитых против чумы доноров до года после прививки. Очередная ежегодная вакцинация индуцировала у лиц из группы 2 дополнительные индивидуальные изменения по экспрессии CD45 различной интенсивности. Так, повышение показателя (+5 у. е. и более) было зарегистрировано одновременно через 1 месяц и спустя 6 месяцев у 35% доноров (№ 3, 4, 5, 6, 8, 17, 19), только через 1 месяц у 30% (№ 9, 10, 11, 12, 16, 18) и через 6 месяцев у 10% (№ 1, 13). У 25% привитых (№ 2, 7, 14, 15, 20) отмечали сравнительно слабую перестройку по CD45 на НГ (менее +5 у. е.) в течение 6 месяцев после очередной прививки.

## Заключение

Проведенное исследование в условиях *ex vivo* и *in vivo* продемонстрировало способность живых клеток вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ стимулировать повышение плотности экспрессии ТПФ (CD45) на поверхности гранулоцитов периферической крови человека, зависящее от степени устойчивости бактерий к фагоцитозу и киллингу НГ, которое после первичного контакта со специфическим антигеном может сохраняться на повышенном уровне до года после противочумной вакцинации. Выявленные изменения по исследуемому показателю могут быть связаны с «иммунной памятью», формируемой в процессе иммунологической перестройки на уровне рецепторов клеток врожденного иммунитета, от которой зависит развитие более быстрого и интенсивного антигенспецифического иммунного ответа на повторное введение в организм клеток *Y. pestis*, в том числе и ВЧЖ. В перспективе, полученные в работе экспериментальные данные могут быть использованы для разработки информативных критериев оценки эффективности противочумной вакцинации у людей, в частности, при обосновании изменения индивидуальных сроков проведения очередной вакцинации против чумы по эпидемическим показаниям контингенту риска.

## Список литературы / References

1. Богачева Н.В., Крючков А.В., Дармов И.В., Воробьев К.А., Печенкин Д.В., Елагин Г.Д., Колесников Д.П. Экспериментальная оценка методом проточной цитофлуориметрии уровня клеточной иммунологической памяти у лиц, вакцинированных против чумы и сибирской язвы // Клиническая лабораторная диагностика, 2013. № 11. С. 48-53. [Bogatcheva N.V., Kryutchkov A.V., Darmov I.V., Vorobyev K.A., Petchenkin D.V., Elagin G.D., Kolesnikov D.P. The experimental evaluation with flow cytometry technique of the level of cellular immunologic memory in persons vaccinated against plague and anthrax. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2013, no. 11, pp. 48-53. (In Russ.)]
2. 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 vaksinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2019, Vol. 18, no. 6, pp. 26-33. (In Russ.)]
3. Кравцов А.Л., Бугоркова С.А., Ключева С.Н., Кожевников В.А., Кудрявцева О.М. Определение экспрессии FcγRIIIB (CD16) на поверхности нейтрофилов крови привитых против чумы людей // Молекулярная медицина, 2020. Т. 18, № 2. С. 33-38. [Kravtsov A.L., Bugorkova S.A., Klyueva S.N., Kozhevnikov V.A., Kudryavtseva O.M. Determination of FcγRIIIB (CD16) expression on the surface of blood neutrophils in anti-plague vaccinated people. *Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine*, 2020, Vol. 18, no. 2, pp. 33-38. (In Russ.)]
4. Кравцов А.Л., Гончарова А.Ю., Бугоркова С.А., Девдариани З.Л., Кожевников В.А. Формирование нейтрофильных внеклеточных ловушек при моделировании чумной инфекции у мышей, иммунизированных *Yersinia pestis* EV НИИЭГ // Проблемы особо опасных инфекций, 2020. № 4, С. 70-74. [Kravtsov A.L., Goncharova A.Yu., Bugorkova S.A., Devdariani Z.L., Kozhevnikov V.A. Formation of neutrophil extracellular traps when modeling plague infection in mice immunized with *Yersinia pestis* EV NIEG. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2020, no. 4, pp. 70-74. (In Russ.)]

5. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Евглевский А.А., Нгуен Т.Л. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм. Часть 2 // Инфекция и иммунитет, 2018. Т. 8, № 1. С. 7-18. [Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtadidze L.V., Kovaleva S.V., Evglevsky A.A., Nguyen T.L. The new look at neutrophilic granulocytes: rethinking old dogmas. Part 2. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2018, Vol. 8, no. 1, pp. 7-18. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-7-18.
6. Плехова Н.Г. Бактерицидная активность фагоцитов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2006. № 6. С. 89-96. [Plekhoval N.G. The bactericidal activity of phagocytes. *Zhurnal mikrobiologii epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2006, no. 6, pp. 89-96. (In Russ.)]
7. Brunzk N., Lubojemska A., Hardison S., Wang Q., Gutierrez M., Brown G.D., Papayannopoulos V. Neutrophils sense microbial size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat. Immunol.*, 2014, Vol. 15, no. 11, pp. 1017-1025.
8. Gao H., Henderson A., Kenneth C., Landreth S., Erisson S.E. Effects of the protein tyrosine phosphatase CD45 on FcγRIIIa signaling and neutrophil function. *Exp. Hematol.*, 2000, Vol. 28, no. 9, pp. 1062-1070.
9. Khodoun M.V., Strait R., Armstrong L., Yanase N., Frankelmann F.D. Identification of markers that distinguish IgE-from IgG-mediated anaphylaxis. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 2011, Vol. 108, no. 30, pp. 12413-12418.
10. Landoni V.I., Chiarella P., Martire-Greco D., Schierloh P., van-Rooijen N., Rearte B., Palermo M.S., Isturiz M.A., Fernandez G.C. Tolerance to lipopolysaccharide promotes an enhanced neutrophil extracellular traps formation leading to a more efficient bacterial clearance in mice. *Clin. Exp. Immunol.*, 2012, Vol. 168, no. 1, pp. 153-163.
11. Mitchell G.B., Khandaker M.H., Rahimpour R., Xu L., Lazarovits A.I., Pickering J.G., Suria H., Madrenas J., Pomerantz D.K., Feldman R.D., Kelvin D.J. CD45 modulation of CXCR1 и CXCR2 in human polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunology*, 1999, Vol. 29, pp. 1467-1476.
12. Mócsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J. Exp. Med.*, 2013. Vol. 210, no. 7, pp. 1283-1299.
13. Rosales C., Uribe-Querol E. Neutrophil activation by antibody receptors. In book: Neutrophils. Ed. Khajah M. London: Intechopen limited, 2019. 85 p.
14. Shannon J.G., Hasenkrug A.M., Dorward D.W., Nair V., Carmody A.B., Hinnebusch B. *Yersinia pestis* subverts the dermal neutrophil response in a mouse model of bubonic plague. *mBio*, 2013, Vol. 5, no. 4, e00170-13. doi: 10.1128/mbio.00170-13.
15. Vera E.J., Chew Y.V., Nicholson L., Bruns H., Anderson P., Chen H.T., Williams L., Keung K., Zanjani N.T., Dervish S., Patrick E., Wang X.M., Yi S., Hawthorne W., Alexander S., O'Connell P.J., Hu M. Standardization of flow cytometry for whole blood immunophenotyping of islet transplant and transplant clinical trial recipients. *PLoS One*, 2019, Vol. 14, no. 5, e0217163. doi: 10.1371/journal.pone.0217163.

---

**Авторы:**

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

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

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

**Бугоркова С.А.** — д.м.н., и. о. заведующего  
отделом иммунологии ФКУН «Российский научно-  
исследовательский противочумный институт  
«Микроб»», г. Саратов, Россия

---

**Authors:**

**Kravtsov A.L.**, PhD, MD (Medicine), 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

**Bugorkova S.A.**, PhD, MD (Medicine), Acting Head,  
Department of Immunology, Russian Research Anti-Plague  
Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

---

Поступила 01.02.2023  
Принята к печати 16.02.2023

---

Received 01.02.2023  
Accepted 16.02.2023