

РЕАКЦИЯ FC γ R11B НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ
FC γ R11B REACTION OF BLOOD NEUTROPHILS

**РАЗЛИЧНАЯ РЕАКЦИЯ FC γ R11B (CD16) НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ
ЧЕЛОВЕКА НА МОДЕЛИРОВАНИЕ БАКТЕРИЕМИИ *EX VIVO*
ПАТОГЕННЫМИ И УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫМИ
МИКРООРГАНИЗМАМИ**

Кравцов А. Л. ¹,
Клюева С. Н. ¹,
Шмелькова Т. П. ¹,
Кожевников В. А. ¹,
Бугоркова С. А. ¹

¹ ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт
«Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия.

РЕАКЦИЯ FC_γRIIB НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ
FC_γRIIB REACTION OF BLOOD NEUTROPHILS

**DIFFERENT RESPONSE OF HUMAN BLOOD NEUTROPHIL FC_γRIIB
(CD16) TO *EX VIVO* MODELING OF BACTEREMIA BY PATHOGENIC
AND OPPORTUNISTIC MICROORGANISMS**

Kravtsov A. L. ^a,
Klyueva S. N. ^a,
Shmelkova T. P. ^a,
Kozhevnikov V. A. ^a,
Bugorkova S. A. ^a

^a FKUN Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of Rospotrebnadzor, Saratov,
Russian Federation.

Резюме

Наличие Fc_γRIIIb (CD16) на поверхности нейтрофильных гранулоцитов (НГ) крови человека наделяет эти клетки через взаимодействие с IgG ключевым свойством адаптивного иммунитета: антигенспецифическим клеточным ответом. **Целью работы** явилось сравнение *ex vivo* реакции Fc_γRIIIb НГ человека в ответ на добавление в кровь живых клеток условно-патогенных (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) и патогенных (*Yersinia pestis*, *Brucella abortus*) видов бактерий. **Материалы и методы.** Плотность экспрессии CD16 на НГ определяли методом проточной цитометрии в условных единицах интенсивности флуоресценции (MFI) после окраски лейкоцитов реагентами CD45-FITC и CD16-PE (Becton Coulter, USA) при иммунофенотипировании их в крови согласно Lyse/No-Wash протоколу. Для моделирования бактериемии использовали аттенуированные (вакцинные) штаммы *B. abortus* 19ВА и *Y.pestis* EV НИИЭГ, а также штаммы *S. aureus* ATCC 6538 (209-P) и *E.coli* ATCC 25922. Кровь получали от здоровых доноров (n=10), не прививавшихся от чумы и бруцеллеза. Бактерии 4-х видов добавляли в образцы крови каждого донора в дозе 10⁸ м.к./мл и результаты учитывали по исследуемому показателю через 30 мин, 1, 2 и 6 ч инкубации. **Результаты.** Условно-патогенные бактерии, в отличие от *Y. pestis* и *B. abortus*, вызывали, начиная с 2 ч инкубации, резкое снижение плотности экспрессии Fc_γRIIIb на НГ крови человека, что являлось маркером развития *ex vivo* IgG-обусловленной анафилаксии, связанной с присутствием в крови всех здоровых взрослых людей IgG к специфическим антигенам *E. coli* и *S.aureus*. Изменения по маркеру CD16, индуцируемые в НГ условно-патогенными бактериями, предшествовали дегрануляции и лизису этих клеток в условиях *ex vivo*, в то время как в присутствии *Y. pestis* и *B. abortus* нейтрофилы в течение 6 ч не подвергались дегрануляции и цитолизу. **Заключение.** Полученные в работе экспериментальные данные отражают известный факт участия в обезвреживании *E. coli* и *S.aureus* феномена внеклеточной антителозависимой цитотоксичности НГ, который реализуется в потоке крови с помощью механизма нетоза и играет решающую роль в предотвращении сепсиса. Отсутствие реакции молекулярного триггера нетоза CD16 на *Y. pestis* и *B. abortus* свидетельствует о том, что в организме человека, не привитого против чумы или бруцеллёза, этот защитный антителозависимый механизм бактерицидности не работает. Оценка реактивности Fc_γRIIIb с использованием проточной цитометрии на модели бактериемии *ex vivo* перспективна для разработки информативного теста оценки специфического иммунитета.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia pestis*, *Brucella abortus*, Fc_γR1bб (CD16), IgG-обусловленная анафилаксия, нетоз, модель бактериемии ex vivo, проточная цитометрия.

Abstract

The presence of Fc_γRIIIb (CD16) on the surface of neutrophil granulocytes (NG) in human blood endows these cells, through interaction with IgG, with a key property of adaptive immunity: an antigen-specific cellular response. The purpose of the work was to compare the *ex vivo* reaction of human neutrophil Fc_γRIIIb in response to the addition in blood the live cells of opportunistic (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) and pathogenic (*Yersinia pestis*, *Brucella abortus*) bacterial species. Materials and methods. The density of CD16 expression on NG was determined by flow cytometry after staining of blood leukocytes with CD45-FITC and CD16-PE reagents according to the Lyse/No-Wash immunophenotyping protocol. To model bacteremia, we used attenuated (vaccine) strains *B. abortus* 19BA and *Y. pestis* EV NIEG, as well as strains *S. aureus* ATCC 6538 and *E. coli* ATCC 25922. Blood was obtained from healthy donors (n= 10), who were not vaccinated against plague and brucellosis. Bacteria of 4 species were added to the blood samples of each donor in the same dose of 10⁸ mc/ml and the results were taken into account after 30 minutes, 1, 2 and 6 hours of incubation. Results. Opportunistic bacteria, in contrast to *Y. pestis* and *B. abortus*, caused a sharp decrease in the density of Fc_γRIIIb expression on human blood NG after 2 hours of incubation. Changes in the CD16 marker induced in NG by opportunistic bacteria preceded degranulation and lysis of these cells, while in the presence of *Y. pestis* and *B. abortus* neutrophils did not undergo degranulation and cytolysis within 6 hours. Conclusion. Obtained experimental data reflect the participation in neutralization of *E. coli* and *S. aureus* of the antibody-dependent cytotoxicity phenomenon of NG, which is realized in the bloodstream using the NETosis mechanism and plays a decisive role in the prevention of sepsis. The absence of molecular trigger NETosis reaction to *Y. pestis* and *B. abortus* indicates that in the human body not vaccinated against plague or brucellosis, this protective antibody-dependent mechanism does not work. Evaluation of Fc_γRIIIb reactivity in an *ex vivo* bacteremia model is promising for assessing the intensity of post-vaccination immunity in humans.

Keywords: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia pestis*, *Brucella abortus*, Fc_γRIIIb (CD16), IgG-mediated anaphylaxis, NETosis, *ex vivo* bacteremia model, flow cytometry.

1 Введение

Нейтрофильные гранулоциты (НГ) обеспечивают защиту от инфекции, осуществляя киллинг бактерий с помощью механизмов фагоцитоза, секреторной дегрануляции и нетоза. Они обладают уникальными возможностями активации и регуляции иммунного ответа [3], а наличие на поверхности НГ Fc_γ-рецепторов (Fc_γR) наделяет эти клетки через взаимодействие с IgG ключевым свойством адаптивного иммунитета: антигенспецифическим клеточным ответом [15]. При взаимодействии с IgG, входящими в состав иммунных комплексов (ИК), активируется, через сигналы от Fc_γR, бактерицидная функция НГ и стимулируется секреция нейтрофилами крови сенсibilизированного организма медиаторов воспаления (IL-6, лейкоцитарных протеаз, фактора активации тромбоцитов) при альтернативных IgG-обусловленных адаптивных аллергических и анафилактических реакциях [6].

Fc_γRIIIb (CD16) – это уникальный рецептор нейтрофилов крови человека, выполняющий в процессе гомеостаза физиологическую функцию удаления ИК из сосудистого русла [10, 15]. В опытах на трансгенных мышах, НГ которых экспрессировали человеческие Fc_γR для IgG антител, было установлено, что при появлении в крови IgG к антигену, ранее использованному для подкожной иммунизации животных, внутривенное введение в иммунный организм высокой дозы данного антигена запускает *in vivo* защитную системную IgG-обусловленную анафилактическую реакцию, в развитии которой ключевую роль играет процесс функциональной активации НГ комплексами антиген-IgG через Fc_γRIIIb на клеточной поверхности [7].

Быстрое и интенсивное снижение плотности экспрессии Fc_γRIIIb (CD16) на поверхности НГ, согласно исследованиям на трансгенных животных, может служить индикатором присутствия в крови активных специфических IgG к внутривенно вводимому в организм исследуемому антигену, и, главное, надежным маркером, позволяющим дифференцировать с помощью проточной цитометрии IgG-зависимую анафилаксию, связанную с активацией НГ периферической крови, от IgE-обусловленной анафилактической реакции, обычно развивающейся в результате стимуляции тучных клеток и базофилов [8]. В настоящее время установлено, что, связываясь со специфическими IgG в составе комплексов антиген-антитело, Fc_γRIIIb выполняет на поверхности НГ сигнальную функцию молекулярного триггера нетоза [10] – механизма внеклеточной антителозависимой цитотоксичности (бактерицидности) НГ, играющего решающую роль в предотвращении сепсиса, вызываемого у животных такими условно-патогенными бактериями как *E. coli* и *S. aureus* [9]. Однако на модели бактериемии *ex vivo* не изучалась реакция Fc_γRIIIb нейтрофилов крови человека, как маркера IgG-зависимой анафилаксии и триггера нетоза, в экспериментах с возбудителями особо опасных бактериальных инфекций, такими как *Y. pestis* и *B. abortus*, эффективно подавляющими функционирование бактерицидных систем НГ и развитие

44 защитной воспалительной реакции в организме на начальной стадии развития
45 инфекционного процесса [5,12].

46 Целью настоящей работы явилось сравнение реакции Fc γ R1Пв
47 нейтрофилов человека в ответ на добавление в кровь живых патогенных
48 (*B.abortus*, *Y. pestis*) и условно-патогенных (*E. coli*, *S. aureus*) видов бактерий с
49 использованием проточно-цитофлуориметрического анализа.

50 **Материалы и методы.**

51 В исследованиях использовали аттенуированные (вакцинные) штаммы
52 *B. abortus* 19ВА и *Y.pestis* EV НИИЭГ, а также штаммы *S. aureus* ATCC 6538
53 (209-P) и *E.coli* ATCC 25922 из Государственной коллекции патогенных
54 бактерий ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб»
55 Роспотребнадзора. Двухсуточную культуру *B. abortus* выращивали на
56 бруцеллагаре (рН 6,9) при температуре 37 °С. Экспоненциальную 18-часовую
57 культуру *Y. pestis* получали путем выращивания с аэрацией на бульоне
58 Хоттингера (рН 7,2) при 37 °С. При той же температуре выращивали на агаре
59 Хоттингера (рН 7,2) суточные культуры *S. aureus* и *E.coli*. В стерильном
60 фосфатно-солевом буфере (рН 7,4) с 0,9% NaCl (ФСБ) готовили по
61 стандартному образцу мутности из выращенных культур взвеси живых
62 бактерий с концентрацией 10⁹ м.к./мл.

63 Кровь забирали из локтевой вены в пробирки с антикоагулянтом
64 (гепарином) в количестве 8-10 мл и использовали в течение 1-2 ч. Исследовали
65 образцы крови 10-и условно здоровых доноров (3 мужчин и 7 женщин)
66 возрастом от 25 до 55 лет, никогда не прививавшихся против чумы и
67 бруцеллёза. Забор крови у всех участников исследования проводили на
68 основании должным образом оформленного добровольного
69 информированного согласия.

70 На 1 мл цельной крови человека добавляли 100 мкл миллиардной взвеси
71 (1x10⁸ м.к./мл), что соответствовало в среднем микробной нагрузке в крови
72 около 50 м.к. на фагоцит. В одинаковых экспериментальных условиях
73 оценивалась реакция НГ каждого донора по исследуемому показателю на 4
74 вида бактерий, для чего использовали 4 опытных образца крови - с клетками
75 *B. abortus*, *Y.pestis*, *S. aureus* и *E.coli* соответственно. Изменения в уровне
76 экспрессии CD16 на поверхности НГ в условиях моделирования бактериемии
77 *ex vivo* живыми клетками 4-х исследуемых штаммов микроорганизмов
78 регистрировали в динамике: через 30 мин, 1, 2 и 6 ч инкубации крови при
79 37°С. Контролем служили результаты анализа в аналогичные сроки образцов
80 крови тех же доноров без добавления в них бактерий.

81 Лейкоциты в исследуемых образцах цельной крови окрашивали
82 мечеными мышинными моноклональными антителами CD45-FITC и CD16-PE
83 (Bacman Coulter, USA) согласно Lyse/No Wash протоколу
84 иммунофенотипирования фирмы BD Bioscience (USA), обеспечивающему
85 высокую степень стандартизации результатов клинических цитологических
86 исследований [14]. Гранулоциты дифференцировали методом проточной
87 цитометрии от других экспрессирующих CD45 клеток крови (лимфоцитов и

88 моноцитов) по интенсивности бокового светорассеяния, зависящей от степени
89 их внутриклеточной гранулярности, и нейтрофилы идентифицировали в гейте
90 гранулоцитов как клетки с высоким уровнем экспрессии CD16. Плотность
91 экспрессии CD16 на поверхности НГ оценивали в условных единицах
92 интенсивности флуоресценции (MFI) на цитометре DakoCytomation (Дания) с
93 программным обеспечением Summit v.4.3 Built 2445 [1]. Через 6 ч инкубации
94 определяли в крови методом проточной цитометрии долю нейтрофилов,
95 утративших свою исходно высокую степень внутриклеточной гранулярности
96 в результате дегрануляции и цитолиза [2]. По аналогии с показателем
97 повреждения нейтрофилов (ППН), обычно оцениваемым в крови с помощью
98 субъективного микроскопического анализа [4], значения данного показателя
99 при моделировании бактериемии *ex vivo* рассчитывали как $ППН = \frac{D^k - D^o}{D^k}$, где
100 D^k и D^o – это процент клеток, регистрируемых цитометром в гейте
101 гранулоцитов спустя 6 ч инкубации, соответственно, в контрольном и
102 опытном образцах крови.

103 Для статистической обработки экспериментальных данных
104 использовали Microsoft Excel 2016 и Statistica 10.0 (StatSoft Inc.). Результаты
105 представляли в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q25–Q75)
106 с расчетом достоверности различий в исследуемых группах с использованием
107 U-критерия Манна–Уитни. Различие групп полагали статистически значимым
108 при значениях $p < 0,05$.

109 **Результаты и обсуждение**

110 Попадая в кровь человека, живые клетки *E. coli* и *S. aureus* уже к 2 ч
111 инкубации индуцировали существенное снижение плотности экспрессии
112 Fc_γRIIIb (CD16) на поверхности НГ в сравнении с контролем, которое
113 наглядно иллюстрируют характерные гистограммы, представленные на рис.1.
114 Так, в исходном контрольном образце крови (0 ч инкубации) у донора было в
115 суммарной популяции гранулоцитов 91,09 % НГ с экспрессией на клетку
116 CD16, равной в среднем 421,88 усл. ед. (Mean для клеток в регионе R10), и
117 коэффициентом вариации (CV) по данному параметру 21,03%. Через 2 ч
118 экспрессия CD16 на НГ повышалась в контроле под влиянием процесса
119 инкубации до значения 556,24 у.е. (на 23 %), а CV увеличивался до 24,78 %.
120 Быстрое шестикратное падение среднего уровня экспрессии CD16 на
121 поверхности НГ в присутствии *E. coli* и *S. aureus*, до 87,78 и 81,64 у.е.
122 соответственно, при трехкратном увеличении неоднородности (CV)
123 отдельных клеток по исследуемому показателю свидетельствовало о наличии
124 в крови донора функционально активных IgG к специфическим антигенам
125 кишечной палочки и золотистого стафилококка. Это подтверждают
126 литературные данные о высоких титрах специфических IgG к антигенам *E. coli*
127 и *S. aureus* в организме всех здоровых взрослых людей [11,13]. Клетки этих
128 двух видов бактерий продуцировали в плазму бактериальные антигены,
129 которые, формируя ИК при взаимодействии с IgG, запускали через
130 стимуляцию Fc_γRIIIb на клеточной поверхности активацию НГ крови человека

131 на модели бактериемии *ex vivo*, характерную для IgG-обусловленной
132 защитной анафилактической реакции.

133 Важно, что в крови того же донора через 2 ч отсутствовала такая
134 интенсивная реакция по клеточному маркеру IgG-зависимой анафилаксии в
135 ответ на живые клетки *B. abortus* или *Y. pestis*. Экспрессия CD16 в ответ на эти
136 патогенные бактерии снижалась относительно контроля в условиях *ex vivo*
137 всего на 29 % (до 395,79 у.е.) и 15 % (до 474,62 у.е) соответственно. Видимо,
138 по причине отсутствия в крови IgG к специфическим антигенам *B. abortus* и
139 *Y. pestis*. При проведении сравнительного анализа НГ по маркеру CD16 в
140 образцах крови других доноров, не привитых вакцинами против чумы и
141 бруцеллёза, были получены на модели бактериемии *ex vivo* аналогичные
142 результаты, отражающие достоверные различия по исследуемому показателю
143 через 2 ч инкубации для исследуемых видов патогенных и условно-
144 патогенных бактерий. Лишь к 6 ч вдвое снижалась плотность экспрессии
145 CD16 на НГ в ответ на клетки *B. abortus* и в меньшей степени (на 30 %) в ответ
146 на клетки *Y. pestis* (таблица). Возможно, это было связано с известной
147 способностью ЛПС возбудителя бруцеллёза вызывать при фагоцитозе
148 преждевременную гибель нейтрофилов крови человека, в отличие от
149 макрофагов и дендритных клеток. Причем, без развития в погибших НГ
150 предшествующих нетозу провоспалительных фенотипических изменений,
151 индуцируемых в этих клетках ЛПС *E. coli* [5].

152

153 **Рисунок 1.** Изменения плотности экспрессии Fc γ RIIIb(CD16) на поверхности нейтрофилов
154 крови человека при моделировании бактериемии *ex vivo* живыми клетками *E. coli*,
155 *S. aureus*, *B. abortus* и *Y. pestis*.

156 Таблица. Изменения плотности экспрессии Fc γ RIIIb (CD16) на нейтрофильных
157 гранулоцитах крови человека при взаимодействии с *E. coli*, *S. aureus*, *Y. pestis* и *B. abortus*
158 на модели бактериемии *ex vivo*

159

160 Интенсивные фенотипические изменения в уровне экспрессии Fc γ RIIIb
161 (CD16), индуцируемые условно-патогенными бактериями, являлись
162 триггером развития в НГ периферической крови выраженных дегенеративных
163 изменений по показателям дегрануляции и цитолиза, характерных для нетоза.
164 Как следует из цитограмм, представленных на рис.2, НГ подвергались
165 дегрануляции и цитолизу к 6 ч при моделировании бактериемии *ex vivo*
166 живыми клетками *E. coli*, но не клетками *B. abortus* и *Y. pestis*. Стафилококк
167 оказывал по нашим данным на НГ человека *ex vivo* воздействие по показателям
168 дегрануляции и цитолиза аналогичное эффекту *E. coli* [2]. Значения ППН,
169 вычисленные через 6 ч по результатам сравнительного цитометрического
170 анализа (пример расчета приведен в примечании к рис. 2) были для *E. coli*, *S.*
171 *aureus*, *B. abortus* и *Y. pestis* соответственно 0,78 (0,71-0,85); 0,88 (0,84-0,91);
172 0,11(0,08-0,14) и 0,13(0,09-0,18), что достоверно ($p < 0,05$) отличало реакцию на
173 *E. coli* и *S. aureus* от реакции НГ на *B. abortus* и *Y. pestis*.

174

175

176 Рисунок 2. Интенсивность дегрануляции и лизиса нейтрофилов в крови, обсемененной
177 живыми клетками *E. coli*, *B. abortus* и *Y. pestis*.
178 Figure 2. Neutrophil degranulation and lysis intensity in blood contaminated with live *E. coli*,
179 *B. abortus* and *Y. pestis* cells.

180 Полученная в настоящей работе информация согласуется с результатами
181 опытов на лабораторных животных, в которых было установлено, что для
182 эффективного киллинга в потоке крови *E. coli* и *S. aureus* организм использует
183 *in vivo* механизм внеклеточной антителозависимой бактерицидности НГ,
184 реализуемый в сосудистом русле с помощью нетоза [9]. С другой стороны,
185 наши данные о различной реакции молекулярного триггера нетоза CD16,
186 полученные *ex vivo* с помощью проточной цитометрии для крови,
187 обсемененной исследуемыми патогенными и условно-патогенными
188 бактериями, подтверждают выводы исследований *in vitro*, выполненных ранее
189 на модели выделенных из крови нейтрофилов, в которых, как и в настоящей
190 работе, была установлена способность возбудителей чумы и бруцеллеза
191 подавлять в НГ процессы дегрануляции и нетоза [5, 12]. Для аллергенов,
192 вызывающих *in vitro* активацию НГ крови человека, характерную для IgG-
193 обусловленной анафилаксии, в настоящее время установлена прямая
194 корреляция с их способностью индуцировать в сенсibilизированном
195 организме внутрикожную аллергическую реакцию Артюса [16], а также
196 интенсивную реакцию повреждения нейтрофилов, регистрируемую в крови
197 субъективным методом микроскопического анализа [4]. Учитывая ранее
198 полученные нами данные о способности аллергена чумного микроба (пестина)
199 индуцировать *ex vivo* снижение уровня экспрессии CD16 на НГ крови
200 привитых против чумы людей [1], проточную цитометрию лейкоцитов крови
201 по исследуемому показателю при моделировании бактериемии *ex vivo*
202 живыми клетками *B. abortus* и *Y. pestis*, по-видимому, можно будет
203 использовать для характеристики состояния приобретенного
204 поствакцинального иммунитета у лиц, привитых вакцинами против чумы и
205 бруцеллеза.

206 **Заключение.** Таким образом, с использованием проточной цитометрии
207 и живых клеток четырёх видов бактерий впервые получены
208 экспериментальные данные, демонстрирующие возможность определения у
209 людей состояния адаптивного иммунитета к исследуемому инфекционному
210 агенту по антигенспецифическому ответу Fc_γRIIIb (CD16) НГ периферической
211 крови на модели бактериемии *ex vivo*. Такой ответ клеток первой линии
212 антибактериальной защиты по маркеру CD16, характерный для IgG-
213 обусловленной анафилаксии, регистрировался у всех доноров в опытах с *E.*
214 *coli* и *S. aureus*, но отсутствовал в крови тех же доноров при добавлении
215 *B. abortus* или *Y. pestis*. Выявленные различия по данному показателю для
216 исследованных видов бактерий дают основание считать, что определение
217 реактивности НГ по маркеру Fc_γRIIIb (CD16) на модели бактериемии *ex vivo*
218 перспективно с точки зрения диагностики инфекционной аллергии и, в
219 частности, оценки состояния поствакцинального иммунитета у людей,
220 привитых против чумы и бруцеллёза.

ТАБЛИЦЫ

Таблица 1. Изменения плотности экспрессии Fc γ RIIIb (CD16) на нейтрофильных гранулоцитах крови человека при взаимодействии с *E. coli*, *S. aureus*, *Y. pestis* и *B. abortus* на модели бактериемии *ex vivo*.

Table 1. Changes in CD16 expression density on human blood neutrophil granulocytes upon interaction with *E. coli*, *S. aureus*, *Y. pestis* and *B. abortus* on an *ex vivo* model of bacteremia.

Образцы крови blood samples	Плотность экспрессии CD16 в различные сроки инкубации (y.e.), Me(Q25–Q75) CD16 expression density at different incubation times (c.u.), Me(Q25–Q75)			
	30 мин 30 min	60 мин 60 min	120 мин 120 min	360 мин 360 min
без бактерий (контроль) without bacteria (control)	414 (372-448)	472 (436-500)	540 (496-588)	455 (363-517)
с <i>E. coli</i> with <i>E. coli</i>	386 (348-420)	304* (268-352)	112* (80-144)	44* (36-50)
с <i>S. aureus</i> with <i>S. aureus</i>	392 (366-434)	254* (218-270)	123* (75-152)	48* (40-56)
с <i>Y. pestis</i> with <i>Y. pestis</i>	450 (402-514)	486 (424-522)	498 (460-530)	314* (232-428)
с <i>B. abortus</i> with <i>B. abortus</i>	420 (345-480)	405 (353-447)	430 (365-505)	212* (152-286)

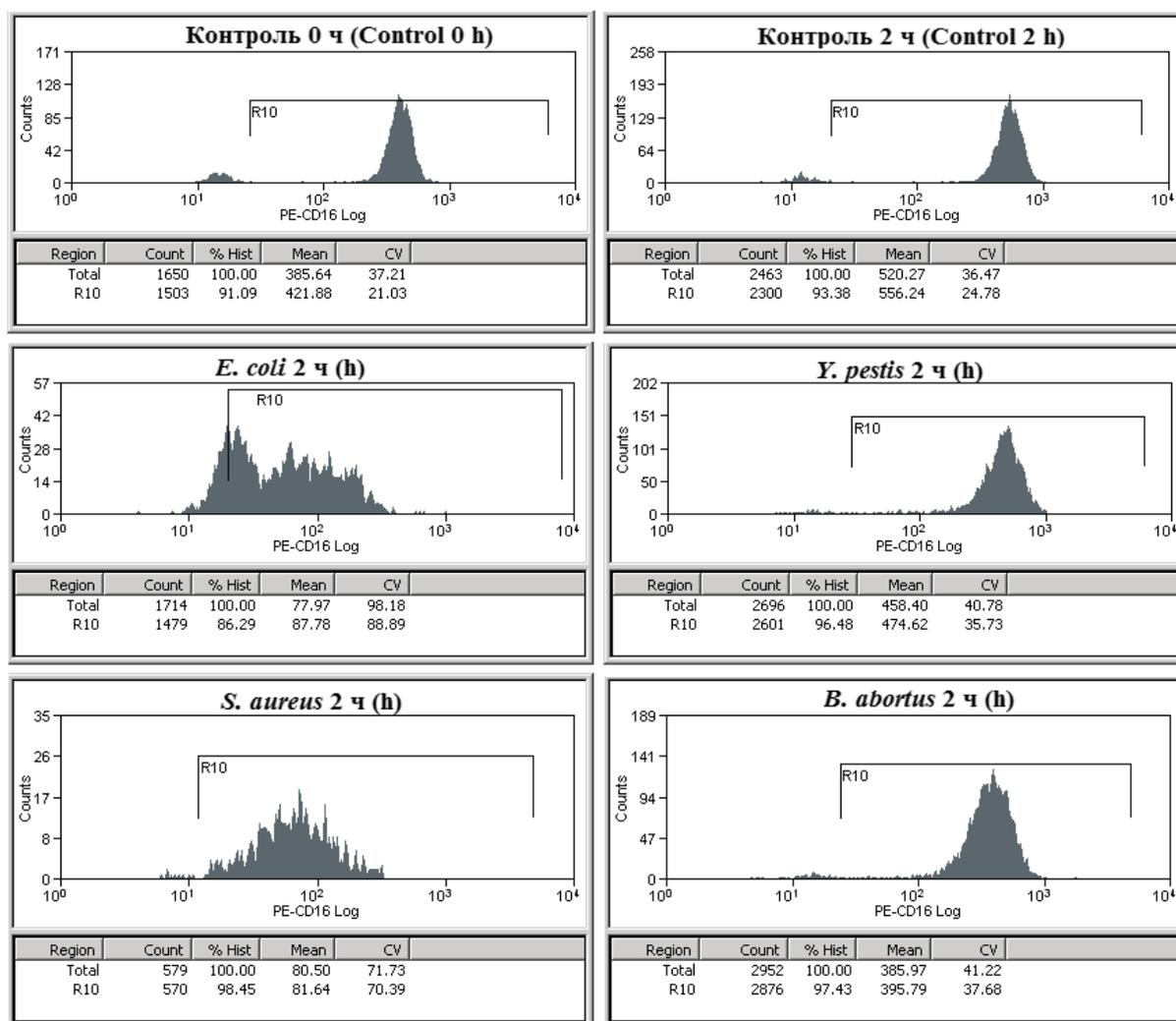
Примечание:* - достоверность различий с контролем;

Note: * - significance of differences with control.

РИСУНКИ

Рисунок 1. Изменения плотности экспрессии Fc γ R11b(CD16) на поверхности нейтрофилов крови человека при моделировании бактериемии ex vivo живыми клетками *E. coli*, *S. aureus*, *B. abortus* и *Y. pestis*.

Figure 1. Changes in Fc γ R11b(CD16) expression density on human blood neutrophil surface when modeling ex vivo bacteremia with living cells of *E. coli*, *S. aureus*, *B. abortus* and *Y. pestis*.



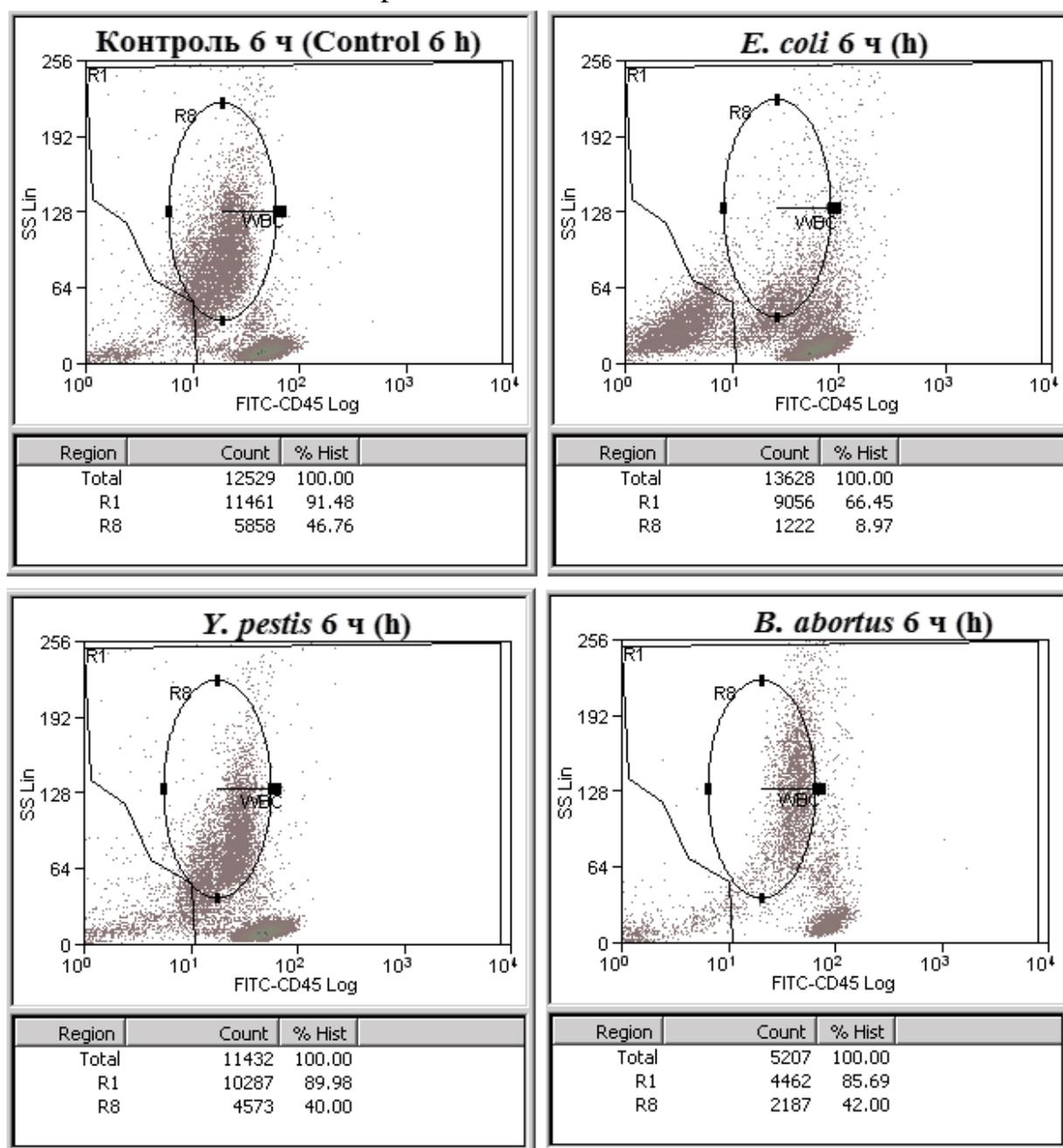
Примечание: результат получен через 2 ч инкубации в опытах с кровью одного и того же донора. R10 – область локализации нейтрофилов на гистограммах. Под каждой гистограммой значения цифр в данной области соответствуют относительному содержанию НГ (% Hist), среднему значению экспрессии CD16 (Mean) и значению коэффициента вариации по исследуемому параметру в популяции нейтрофилов (CV).

Note: the result was obtained after 2 hours of incubation in experiments with blood from the same donor. R10 – area of neutrophil localization in histograms. Under each histogram, the values of the numbers in this area correspond to the relative content of NG (% Hist), the average value of CD16 expression (Mean) and the value

of the coefficient of variation for the studied parameter in the neutrophil population (CV).

Рисунок 2. Интенсивность дегрануляции и лизиса нейтрофилов в крови, обсемененной живыми клетками *E. coli*, *B. abortus* и *Y. pestis*.

Figure 2. Neutrophil degranulation and lysis intensity in blood contaminated with live *E.coli*, *B. abortus* and *Y. pestis* cells.



Примечание: цитограммы распределения лейкоцитов крови по степени внутриклеточной гранулярности (интенсивности бокового светорассеяния SS) и уровню экспрессии суммарного лейкоцитарного антигена CD45 получены через 6 ч инкубации. R8 – область локализации (гейт), соответствующий

РЕАКЦИЯ FC_γR1ПВ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ
FC_γR1ПВ REACTION OF BLOOD NEUTROPHILS

гранулоцитам. За пределами региона R1 локализуется клеточный дебрис – лизированные НГ. Значения показателей повреждения нейтрофилов (ППН) для цитограмм, соответствующих E. coli, B. abortus и Y.pestis, будут $(46,76-8,97/46,76=0,81)$, $(46,76-42,0/46,76=0,10)$ и $(46,76-40,0/46,76=0,14)$.

Note: cytograms of the distribution of blood leukocytes in the degree of intracellular granularity (intensity of side light scattering SS) and the level of expression of the total leukocyte antigen CD45 were obtained after 6 hours of incubation. R8 – localization area (gate), corresponding to granulocytes. Outside the R1 region, cellular debris of lysed NG is localized. The values of neutrophil damage indicators (NDI) for cytograms corresponding to E. coli, B. abortus and Y.pestis will be $(46.76-8.97/46.76=0.81)$, $(46.76-42.0 /46.76=0.10)$ and $(46.76-40.0/46.76=0.14)$.

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Клюева Светлана Николаевна – к.б.н., научный сотрудник отдела иммунологии ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Адрес: 410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, 46

тел.ефон: 8(987)830-50-75

E-mail: klyueva.cvetlana@mail.ru

Klyueva Svetlana Nikolaevna, PhD (Biology), Research Associate Department Immunology, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", 410005, Russian Federation, Saratov, Universitetskaya str., 46

Phone: +7(987)830-50-75,

E-mail: klyueva.cvetlana@mail.ru

Блок 2. Информация об авторах

Кравцов Александр Леонидович – д.б.н., ведущий научный сотрудник отдела иммунологии ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;

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

Шмелькова Татьяна Петровна – к.б.н., старший научный сотрудник отдела образовательных программ и подготовки специалистов ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия;

Shmelkova T.P., [PhD](#) (Biol.), Senior Researcher, Department of Educational Programs and Specialist Training, FKUN Russian Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

[Кожевников Виталий Александрович](#) – младший научный сотрудник отдела иммунологии ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;

Kozhevnikov V.A., Junior Researcher, Department of Immunology Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russian Federation

Бугоркова Светлана Александровна – д.м.н., главный научный сотрудник отдела иммунологии ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;

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

Блок 3. Метаданные статьи

РАЗЛИЧНАЯ РЕАКЦИЯ FC_γR11В (CD16) НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА НА МОДЕЛИРОВАНИЕ БАКТЕРИЕМИИ *EX VIVO* ПАТОГЕННЫМИ И УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ

DIFFERENT RESPONSE OF HUMAN BLOOD NEUTROPHIL FC_γR11В (CD16) TO *EX VIVO* MODELING OF BACTEREMIA BY PATHOGENIC AND OPPORTUNISTIC MICROORGANISMS

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

Реакция FC_γR11В нейтрофилов крови

FC_γR11В reaction of blood neutrophils

Ключевые слова: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia pestis*, *Brucella abortus*, FC_γR11В (CD16), IgG-обусловленная анафилаксия, нетоз, модель бактериемии *ex vivo*, проточная цитометрия.

Keywords: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia pestis*, *Brucella abortus*, FC_γR11В (CD16), IgG-mediated anaphylaxis, NETosis, *ex vivo* bacteremia model, flow cytometry.

Оригинальные статьи.

Количество страниц текста – 5,

Количество таблиц – 1,

Количество рисунков – 2.

09.04.2024

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи
1	Кравцов А.Л., Бугоркова С.А., Ключева С.Н., Кожевников В.А., Кудрявцева О.М. Определение экспрессии Fc γ R11B (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 Fc γ R11B (CD16) expression on the surface of blood neutrophils in anti-plague vaccinated people. <i>Molekulyarnaya meditsina = Molecular medicine</i> , 2020, Vol.18, no.2, pp. 33-38. (In Russ.)]	doi: 10.29296/24999490-2020-02-06.
2	Кравцов А.Л., Бугоркова С.А., Ключева С.А., Шмелькова Т.П., Кожевников В.А. Оценка изменений фенотипа, интенсивности дегрануляции, гибели и лизиса нейтрофилов при моделировании <i>ex vivo</i> стафилококковой бактериемии. Журнал Микробиологии, Эпидемиологии и Иммунобиологии, 2023. Т.100, №4. С.293-305.	[Kravtsov A.L., Bugorkova S.A., Klyueva S.N., Shmelkova T.P., Kozhevnikov V.A. Assessment of changes in the phenotype, intensity of degranulation, death and lysis of neutrophils in <i>ex vivo</i> modeling of Staphylococcal bacteremia. <i>Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology</i> , 2023; Vol.100, no.4, pp. 293-305 (in Russ.)]	doi: https://doi.org/10.36233/0372-9311-384 .

3	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., Lomtatidze 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.
4	Фрадкин В.А. Диагностика аллергии реакциями нейтрофилов крови. М: Медицина, 1985,175с.	[Fradkin V.A. Diagnosis of allergies by reactions of blood neutrophils. M: Medicine, 1985, 175 p (in Russ.)].	
5	Barquero-Calvo E., Mora-Cartín R., Arce-Gorvel V., de Diego J.L., Chacón-Díaz C., Chaves-Olarte E., Gazman-Verri C., Buret A.G., Gorvel J-P., Moreno E. Brucella abortus induces the premature death of human neutrophils through the action of its lipopolysaccharide. PLoS Pathog., 2015, Vol.11, no.5, e1004853.		https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004853 .
6	Granger V., Peyneau M., Chollet-Martin S., de Chaisemartin L. Neutrophil extracellular traps in autoimmunity and allergy: immune complexes at work. Front. Immunology. 2019, 10: 2824.		doi: 10.3389/fimmu.2019.02824.
7	Jönsson F., Mancardi D.A., Kita Y., Karasuyama Y., Iannascoli B., Van Rooijen N., Simizu T., Daeron M., Bruhns P. Mouse and human neutrophils induce		doi: 10.1172/JCI.145232.

	anaphylaxis. J. Clin. Invest. 2011, Vol.121, no.4, pp.1484-1496.		
8	Khodoun M.V., Strait R., Armstrong L., Yanase N., Frankelman F.D. Identification of markers that distinguish IgE-from IgG-mediated anaphylaxis. Proc. Natl. Acad. Sci., 2011, Vol.108, no.30, pp.12413-12418.		doi:10.1073/pnas.1105695108.
9	McDonald B., Urrutia R., Yipp B.G., Jenne C.N., Kubes P. 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.
10	Rosales C., Uribe-Querol E. Neutrophil activation by antibody receptors. In book: Neutrophils. Ed. Khajah M. London: Intechopen limited, 2019, 85p.		doi: 10.5772/intechopen.80666.
11	Santos L.A., Grisolia J.C., Chavasco J.K., Coelho L.F.L., Malaquias L.C.C. Detection of serum antibodies and peripheral blood mononuclear cells response to Escherichia coli antigens in humans. Brazilian Archives of Biology and Technology. 2021, 64: e21200258.		https://doi.org/10.1590/1678-4324-2021200258 .
12	Stasulli M.N., Eichelberger K.R., Price P.A., Pechous R.D., Montgomery S.A., Parler J.S., Gildman W.E. Spatially distinct neutrophil responses within the inflammatory lesion of pneumonic plague. mBio, Vol.6, no.5, e01530-15.		doi: 10.1128/mBio.01530-15.
13	Thomer L., Emolo C., Thammavongsa V., Lim H.K., McAdow M.E., Yu W., Kieffer M., Scheewind O.,		

	Missiakas D. Antibodies against a secreted product of <i>Staphylococcus aureus</i> trigger phagocytic killing. J. Exp. Med. 2016, Vol. 213, no.3, pp. 293-301.		
14	Vera E.J., Chew Y.V., Nicholson L., Bruns H., Anderson P., Chen H.T. et al. 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.
15	Wang Y., Jönsson F. Expression, role, and regulation of neutrophil Fc _γ receptors. Front. Immunology, 2019, 10:1958.		doi: 10.3389/fimmu.2019.01958.
16	Won D.I., Kim S., Lee E.H. Neutrophil oxidative burst as a diagnostic indicator of IgG-mediated anaphylaxis. Blood Res., 2018, Vol.53, no.4, pp.299-306.		doi: 10.5045/br.2018.53.4.299.