

А.Л.Кравцов, Т.П.Шмелькова, Т.Н.Щуковская

**ВЛИЯНИЕ ПРОТИВОЧУМНОЙ ВАКЦИНАЦИИ
НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА ЧЕЛОВЕКА**

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

Важным показателем функциональной активации клеток врожденного иммунитета при воспалительных реакциях, индуцируемых специфическими аллергенами, является секреторная дегрануляция нейтрофилов с высвобождением сериновых протеаз из гранул на поверхность клеток и во внеклеточное пространство. Методом проточной цитофлуориметрии в работе установлено, что гранулоциты крови лиц, привитых живой чумной вакциной (ЖЧВ), отвечают дегрануляцией на контакт в условиях *in vitro* с аллергеном чумного микроба (микробным пестином), в отличие от гранулоцитов крови не вакцинированных людей. Степень активации клеток врожденного иммунитета по данному показателю зависела от срока, прошедшего после прививки. Полученные экспериментальные данные согласуются с современными представлениями о роли лейкоцитарных протеаз в развитии кожного аллергического воспаления и создают необходимую основу для дальнейших исследований, направленных на разработку быстрого инструментального теста оценки противочумного иммунитета у людей в условиях *in vitro*.

Ключевые слова: чумной микроб, противочумный иммунитет, активация клеток врожденного иммунитета, дегрануляция нейтрофилов, проточная цитофлуориметрия.

У людей и животных, привитых живой чумной вакциной, а также у животных, выживших после заражения чумой, наблюдается повышенная чувствительность кожи к внутрикожному введению убитых клеток вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ (микробный пестин). Развивающуюся кожную аллергическую реакцию используют в качестве показателя иммунитета при чуме [1]. Аллергическое воспаление тесно связано с функциональной активацией клеток врожденного иммунитета [7, 8, 12, 14], и альтернативой кожным пробам часто служат биологически безопасные методы оценки антибактериального иммунитета в условиях *in vitro*, основанные на выявлении особенностей морфологии активированных и поврежденных нейтрофилов [4], а также на количественном измерении степени дегенеративных изменений, развивающихся под влиянием специфического аллергена в ядерном хроматине и/или лизосомальных гранулах активированных нейтрофилов крови человека [4, 5]. Количественные методы цитологического анализа не применялись для изучения взаимодействия лейкоцитов цельной крови человека с аллергенами чумного микроба, и способы оценки противочумного иммунитета у людей в условиях *in vitro* в настоящее время не разработаны.

Анализ литературы за последнее десятилетие свидетельствует, что важным показателем функциональной активации клеток врожденного иммунитета при воспалительных реакциях, индуцируемых специфическими аллергенами, является секреторная дегрануляция нейтрофилов с высвобождением сериновых лейкоцитарных протеаз из гранул на поверхность клеток и во внеклеточное пространство [6, 8]. Через 2 ч после внутрикожного введения аллергенов в кожу человека резко повышается активность лейкоцитарной эластазы [14], являющейся биохимическим маркером воспалительного процесса [5–11]. Однако микробный пестин как индуктор деграну-

ляции нейтрофилов в образцах цельной крови лиц, привитых и не привитых ЖЧВ, не изучался. Целью работы явилось проведение таких сравнительных исследований с использованием быстрого проточно-цитофлуориметрического метода оценки интенсивности секреторной дегрануляции нейтрофилов крови человека.

Материалы и методы

В работе использовали дефибринированную кровь 17 человек: 12 доноров, накожно привитых ЖЧВ (3 млрд м.к.; вакцина серии 1 № 107) и 5 доноров, никогда не прививавшихся против чумы (группа сравнения). Группу вакцинированных делили на две подгруппы в зависимости от длительности срока, прошедшего после прививки, – от 1 до 4 (7 чел.) и от 12 до 18 месяцев (5 чел.).

Бактерии выращивали на агаре Хоттингера (рН 7,2) при температуре 28 °С в течение 48 ч, готовили в забуференном физиологическом растворе (ЗФР) миллиардную взвесь по стандарту мутности ОСО-42-28-86П и убивали нагреванием при 100 °С в течение 30 мин. Эту взвесь для определения реакции гранул клеток врожденного иммунитета смешивали с цельной кровью человека в соотношении 1:1. Контролем служила кровь, в которую добавляли ЗФР без аллергена пестина. Опытные и контрольные образцы инкубировали при температуре 37 °С в течение 2 ч. По истечении срока инкубации 100 мкл каждого образца добавляли к 3 мл раствора красителя (2 мкг акридинового оранжевого (АО) /мл 0,01 М фосфатного буфера, рН 7,4, содержащего 0,15 М NaCl) для суправитальной окраски лизосомальных гранул лейкоцитов в течение 8 мин при комнатной температуре [13]. Измерение в отдельных лейкоцитах интенсивности красной флуоресценции первичных гранул с эластазной активностью проводили со скоростью

500 кл./с на проточном цитофлуориметре ICP-22 PHUWE (Германия). Из распределений отдельных лейкоцитов по содержанию лизосом на клетку рассчитывали относительное содержание в крови гранулоцитов [13], а также долю гранулоцитов (в %), находящихся в состоянии секреторной азурофильной дегрануляции [2].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия t Стьюдента. Данные представляли в виде средней арифметической величины (M) и ошибки средней арифметической ($\pm m$). Различия считали достоверными при $P < 0,05$ [3].

Результаты и обсуждение

Оценивать степень нарушения стабильности лизосомальных мембран гранулоцитов крови человека (дегрануляцию) при воспалительных заболеваниях инфекционной и неинфекционной этиологии можно по уровню высвобождаемой из клеток протеолитической (эластазной) активности, либо более быстрым альтернативным способом – по снижению уровня аккумуляции в первичных гранулах нейтрофилов крови красителя АО. С помощью проточной цитофлуориметрии, микроскопии и биохимических методов анализа было установлено, что альтернативный цитологический показатель интенсивности дегрануляции строго коррелирует с высвобождением из гранул молекул лейкоцитарной эластазы и, как следствие, с повышением внеклеточной протеолитической активности [5].

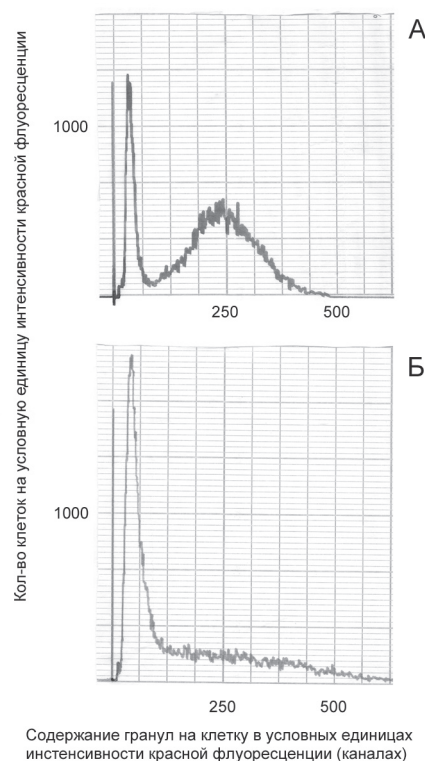
Изменение состояния лизосомальных гранул лейкоцитов крови одного из доноров, привитых ЖЧВ, под влиянием аллергена чумного микроба в условиях *in vitro* представлено на рисунке. Видно, что, когда аллерген в крови отсутствует, гранулоциты аккумулируют в первичных гранулах большое количество молекул АО и по интенсивности красной флуоресценции автоматически учитываются цитометром в области от 150 до 350 условных единиц (каналов). Контрольная гистограмма (А) иллюстрирует хорошо известную способность метода проточной цитофлуориметрии осуществлять быстрый мониторинг состояния лизосомального аппарата гранулоцитов непосредственно в цельной крови человека, без удаления эритроцитов, лимфоцитов и моноцитов [13]. Пик справа на контрольной гистограмме (А) соответствует, в основном, нейтрофилам [2], так как доля этих клеток в суммарной популяции гранулоцитов крови человека составляет более 95 % [8].

Аллерген чумного микроба вызывал дегрануляцию нейтрофилов – нарушение стабильности первичных гранул с эластазной активностью в гранулоцитах крови человека (гистограмма Б). О развитии в отдельных клетках процесса секреторной дегрануляции свидетельствовала утрата способности первичных гранул адсорбировать молекулы АО [5]. Доля гранулоцитов с исходно высокой степенью аккумуляции в гранулах АО в крови уменьшалась и, соот-

ветственно, повышалась доля клеток, обладающих после окраски АО слабой интенсивностью свечения в красной области спектра (от 0 до 150 условных единиц). На опытной гистограмме (Б) слабая интенсивность красной флуоресценции была характерна для лимфоцитов, моноцитов и активированных (дегранулированных) нейтрофилов [2], в то время как на контрольной гистограмме (А) – это только лимфоциты и моноциты [2, 13].

Способность аллергена чумного микроба активировать секреторную функцию нейтрофилов крови человека в условиях *in vitro* зависела от длительности срока, прошедшего после вакцинации и в подгруппе со сроком от 1 до 4 мес. была зарегистрирована более интенсивная активация клеток по данному показателю ($P < 0,001$), чем в подгруппе со сроком от 12 до 18 мес. В тех же условиях (через 2 ч инкубации крови при температуре 37 °С) нейтрофилы крови лиц, не привитых ЖЧВ, не отвечали дегрануляцией на контакт с аллергеном чумного микроба (таблица).

Известно, что непривитые фактически не реагируют на внутрикожное введение микробного пестина, и повышенная реактивность кожи к аллергену чумного микроба отчетливо выражена только тогда, когда есть основание предполагать наличие в организме выраженного противочумного иммунитета [1]. Полученные нами данные косвенно свидетельствуют, что продукты секреторной дегрануляции



Дегрануляция клеток врожденного иммунитета человека (гранулоцитов крови) под влиянием аллергена чумного микроба (пестина):

А – кровь без аллергена чумного микроба, которая содержит около 60 % гранулоцитов (преимущественно нейтрофилов); Б – кровь того же донора, привитого ЖЧВ, через 2 ч после добавления в нее микробного пестина

Влияние противочумной вакцинации на интенсивность дегрануляции клеток врожденного иммунитета, активированных аллергеном чумного микроба в образцах цельной крови человека

Образцы крови	Доля гранулоцитов в состоянии дегрануляции, (M±m) %
Через 1–4 мес после прививки ЖЧВ	49,2±3,6*
Через 12–18 мес после прививки ЖЧВ	20,3±5,9**
Невакцинированные	2,7±1,1

*Уровень достоверности различий с группой сравнения P<0,001;
** P<0,05.

нейтрофилов могут участвовать в развитии кожной воспалительной реакции на месте внедрения аллергена чумного микроба.

При изучении молекулярных механизмов, лежащих в основе развития аллергического воспаления, было установлено, что специфические аллергены активируют нейтрофилы крови сенсибилизированного организма через три типа поверхностных рецепторов к IgE (FcεRI, Fcε RII/CD23 и Mac-2/εBP), запуская характерную дегрануляцию этих клеток с высвобождением лейкоцитарной эластазы из первичных (азурофильных) гранул [10]. Сериновые лейкоцитарные протеазы (эластаза, катепсин G и протеаза 3) являются триггерами и ключевыми регуляторами воспаления, что позволяет использовать интенсивность секреторной дегрануляции нейтрофилов в качестве показателя функциональной активации клеток врожденного иммунитета при воспалительных реакциях, индуцируемых специфическими аллергенами и бактериальными липополисахаридами [5, 6, 8, 10, 14].

Установлено, что лейкоцитарные протеазы сигнализируют о запуске в организме воспалительного процесса и иммунного ответа путем протеолитической активации специальных рецепторов (proteinase-activated receptors-PARs), экспрессируемых на поверхности тромбоцитов, лейкоцитов крови и макрофагов, а также эпителиальных, эндотелиальных, тучных и многих других клеток врожденного иммунитета [12]. Кроме того, они осуществляют тонкую регуляцию интенсивности инфекционного воспаления, модулируя продукцию и активность провоспалительных цитокинов (ФНО, ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8 и др.), а также экспрессию и функцию клеточных рецепторов, ответственных за распознавание бактериальных липополисахаридов и иммунных комплексов (CD14, TLR4, FcR и др.) [6]. В частности, для активации и функционирования TLR4 клеток врожденного иммунитета и развития в организме под влиянием ЛПС синдрома системного воспалительного ответа требуется расщепление гепаран сульфата протеогликана субэндотелиального матрикса эндотелия сосудов лейкоцитарной эластазой [11].

Недавно установлен и подробно описан молекулярный механизм, с помощью которого лейкоцитарные протеазы (эластаза и протеаза 3) усиливают внутрикожное аллергическое воспаление [7]: «при-

мированные» цитокинами нейтрофилы при выходе из сосудистого русла высвобождают протеазы из гранул на клеточную поверхность, а также выделяют в околочелюточную среду супрессор кожного воспаления програнулин; активация нейтрофилов на начальном этапе их миграции в очаг воспаления полностью подавляется избыточным количеством програнулина, продуцируемого также кератиноцитами и кожными эпителиальными клетками; при высокой внутрикожной концентрации специфических иммунных комплексов (антиген-IgE) развивается интенсивная дегрануляция нейтрофилов с гиперсекрецией лейкоцитарных протеаз во внеклеточное пространство, что приводит к быстрому расщеплению супрессора воспаления и, как следствие, к развитию внутрикожной аллергической воспалительной реакции.

Таким образом, полученные в работе экспериментальные данные согласуются с современными представлениями о молекулярных механизмах развития инфекционного воспаления и в состоянии объяснить феномен повышенной чувствительности кожи лиц, привитых ЖЧВ, к микробному пестину. Они создают основу для дальнейших исследований, направленных на разработку быстрого инструментального теста оценки приобретенного противочумного иммунитета у людей в условиях *in vitro*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Коробкова Е.И. Кожная аллергическая реакция как показатель иммунитета при чуме. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.. 1955; 4:40–7.
2. Кравцов А.Л., Бобылева Е.В., Шмелькова Т.П., Куляш Ю.В. Развитие азурофильной дегрануляции нейтрофилов в крови человека, инфицированной *in vitro* стафилококком: эффект микробной нагрузки по данным проточной цитофлуориметрии. В кн.: Актуальные проблемы патологии. Межвуз. сб. науч. работ. Саратов; 2001. С.102–7.
3. Монцевичюте-Эрингене Е.В. Упрощенные математико-статистические методы в медицинской исследовательской работе. Патол. физиол. и эксперим. терапия. 1964; 4:71–8.
4. Фрадкин В.А. Диагностика аллергии реакциями нейтрофилов крови. М.: Медицина; 1985.
5. Abrams W.R., Diamond L.W., Kane A.B. A flow cytometric assay of neutrophil degranulation. J. Histochem. Cytochem. 1983; 31:734–44.
6. Bank U., Ansoerge S. More than destructive: neutrophil-derived serine proteases in cytokine bioactivity control. J. Leukocyte Biology. 2001; 69:197–206.
7. Kessenbrock K., Frohlich L., Sixt M. et al. Proteinase 3 and neutrophil elastase enhance inflammation in mice by inactivating anti-inflammatory progranulin. J. Clin. Invest. 2008; 118:2438–47.
8. Kobayashi S.D., Voyich J.M., Burlak C., DeLeo F.R. Neutrophils in the innate immune response. Arch. Immunol. Ther. Exp. 2005; 53:505–17.
9. Lammers A. M., Van de Kerkhof P.C.M., Schalwijk J., Mier P.D. Elastase, a marker for neutrophils in skin infiltrates. British J. Dermatology. 2006; 115:181–6.
10. Monteseirin J., Bonilla I., Camacho M. J. et al. Specific allergens enhance elastase release in stimulated neutrophils from asthmatic patients. Int. Arch. Allergy Immunol. 2003; 131:174–81.
11. Rosenberg H.F. Toll-like receptors, endogenous ligands, and constitutive control (or, why I m still standing at the podium): an interview with Dr. Jeffrey L. Platt. J. Leukocyte Biology. 2007; 82:286–7.
12. Steinhoff M., Buddenkotte J., Shpacovitch V. et al. Proteinase-activated receptors: transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response. Endocrine Reviews. 2005; 26:1–43.
13. Traganos F., Darzynkiewicz Z. Lysosomal proton pump activity: supravital cell staining with acridine orange differentiates leukocyte subpopulations. Methods in Cell Biology. 1994; 41:185–94.
14. Zweiman B., Kucich U., Shalit M. et al. Release of lacto-

ferrin and elastase in human allergic skin reactions. J. Immunology. 1990; 144:3953–60.

A.L.Kravtsov, T.P.Shmelkova, T.N.Shchukovskaya

Influence of the Anti-Plague Vaccination on the Functional Activity of Human Innate Immunity Cells

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

The essential index of functional activity of innate immunity cells in inflammatory reactions, induced by specific allergens, is the secretory neutrophils degranulation with the release of serine proteases from granules on the cells' surface and into the extracellular space. Using flow cytometry blood granulocytes of persons, immunized with live plague vaccine, were shown to respond to *in vitro* contact with allergen of plague microbe (pestin) by degranulation, in contrast to those of unvaccinated people. The degree of the innate immunity cells activation, as regards this index, depends on the time period passed after the vaccination. The received experimental data agree with modern conceptions on the leukocytic proteases' role in the development of allergic inflammation of skin. They also provide the necessary basis for further investigations, required to develop rapid instrumental test for human anti-plague immunity assessment *in vitro*.

Key words: plague microbe, anti-plague immunity, innate immunity cells activation, neutrophils degranulation, flow cytometry.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Korobkova E.I. [Cutaneous Allergic Response as the Index of Immunity in Plague]. Zh. Microbiol., Epidemiol., Immunobiol. 1955; 4:40–7.
2. Kravtsov A.L., Bobyleva E.V., Shmel'kova T.P., Kulyash Yu.V. [Development of Azurophilic Degranulation in Human Neutrophils Infected *in Vitro* with Staphylococcus: Effect of Microbial Load according to the Data Obtained by Flow Cytometry]. In: Aktual'nye Problemy Patologii. Mezhvuz. Sborn. Nauch. Rabot. Saratov; 2001. P. 102–7.
3. Montsevichute-Eringe E.V. [Simple Mathematic Statistical Methods in Medical Research Work]. Zh. Patol. Physiolog. i Eksperiment. Terapiya. 1964; 4:71–8.
4. Fradkin V.A. [Diagnostic of Allergy by Reactions of Blood Neutrophils]. M.: Medicine; 1985.

Authors:

Kravtsov A.L., Shmelkova T.P., Shchukovskaya T.N. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: microbe@san.ru

Об авторах:

Кравцов А.Л., Шмелькова Т.П., Щуковская Т.Н. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 07.02.10.