

УДК 616-002.71-06:616.98:579.842.23:612.017.1

DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2018.4.53-56

## Влияние токсинов *Yersinia pseudotuberculosis* на реактивность клеток врожденного иммунитета

И.Н. Ляпун, Е.И. Дробот, Л.М. Сомова, Е.В. Псарёва, Н.Ф. Тимченко

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова (690087, г. Владивосток, ул. Сельская, 1)

Токсигенность бактерий псевдотуберкулеза обусловлена продукцией нескольких токсинов, к которым относятся термолabileльный летальный токсин и цитотоксический некротизирующий фактор. В работе охарактеризовано влияние этих токсинов на функциональную активность макрофагов перитонеального экссудата. Выявлено, что на макрофаги более выраженный стимулирующий эффект оказывал цитотоксический некротизирующий фактор, о чем свидетельствовали низкие значения эктоферментов плазмалеммы. При пролонгированном действии токсинов в макрофагах обнаруживалась активация кислородзависимой и нитроксидаобразующей систем. В то же время под воздействием цитотоксического некротизирующего фактора происходило угнетение продукции лизосомальных ферментов (неспецифической эстеразы), тогда как под воздействием термолabileльного токсина активность данного фермента выявлялась в начальные часы инкубации (до 6 часов).

**Ключевые слова:** псевдотуберкулез, термолabileльный летальный токсин, цитотоксический некротизирующий фактор, макрофаги

Псевдотуберкулез, или дальневосточная скарлатиноподобная лихорадка, вызываемый *Yersinia pseudotuberculosis*, широко распространен в Российской Федерации на территории Дальнего Востока и Сибири [1]. Заболевание сопровождается значительным снижением уровня иммунной защиты организма [3]. Основными свойствами *Y. pseudotuberculosis*, связанными с патогенностью, на начальном этапе инфекционного процесса служат адгезивность, инвазивность и токсигенность, которые реализуются уже в первые минуты после попадания возбудителя в организм [4, 12]. Токсигенность бактерий псевдотуберкулеза обусловлена продукцией нескольких токсинов: термостабильного летального токсина, термолabileльного летального токсина (ТЛТ), внешнего мембранного белка системы секреции III типа, суперантигена, а также факторов, нарушающих проницаемость сосудов кожи – раннего и позднего, цитотоксического некротизирующего фактора (cytotoxic necrotizing factor – CNF), которые кодируются генами хромосомы и плазмидой вирулентности [4, 12].

Известно, что для бактерий рода *Yersinia* макрофаг – клетка-мишень *in vivo*, при этом и *Yersinia pestis*, и *Y. pseudotuberculosis* могут выживать и размножаться в этой клетке [6]. Доказано, что иерсинии обладают способностью противостоять бактерицидным и фагоцитарным факторам системы врожденного иммунитета [6, 8]. Так, термостабильный токсин снижает фагоцитарную активность нейтрофилов и мононуклеарных лейкоцитов периферической крови человека. *Y. pseudotuberculosis*, несущая плазмиду вирулентности, ингибируют фагоцитарную активность макрофагов и вызывает апоптоз, как этих клеток, так и нейтрофилов [6, 15]. Также выделение бактериями CNF оказывает влияние на пролиферацию клеток, индуцирует фагоцитоз эпителиоцитов и снижает уровень CR3-опосредованного

макрофагального фагоцитоза, ингибирует выработку оксида азота нейтрофилами [9, 10, 14].

Цель настоящего исследования – анализ влияния ТЛТ и CNF *Y. pseudotuberculosis* на ферментативную активность резидентных макрофагов.

### Материал и методы

Объектами исследования стали белки ТЛТ и CNF, выделенные из штамма *Y. pseudotuberculosis* 2517 III серовара (получен от Н. Mollaret, Франция), по методу, описанному Н.Ф. Тимченко и др. [4]. Оба токсина оказывали цитотоксическое действие на клетки Vero E6. Концентрации вносимых токсинов составили 10 мкг/мл, время наблюдения – от 1 до 48 часов.

Первичную культуру макрофагов получали из перитонеального экссудата морских свинок путем промывания полости брюшины 10 мл холодной (+4 °С) среды 199 («БиолоТ»), включавшей гепарин в концентрации 5 ед./мл. Суспензию клеток доводили до концентрации  $2 \times 10^6$ /мл и разносили в плоскодонные 96-луночные микропланшеты – по 100 мкл на лунку. Для адгезии взвесь перитонеальных макрофагов оставляли в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °С, через 40 мин. клеточный монослой дважды отмывали от неадгезированных элементов и инкубировали в течение трех суток в среде 199 («БиолоТ»), содержавшей 5 % эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone) и 0,004 % гентамицина-К (KRKA), после чего отмывали два раза от антибиотика и использовали в экспериментах. Качество культуры оценивалось методом прижизненного наблюдения с помощью фазово-контрастной микроскопии.

Определение активности аденозинтрифосфатазы (АТФазы) и 5'-нуклеотидазы (аденозинмонофосфатазы – АМФазы) выполняли, добавляя к монослою клеток 20 мкл субстрата: 8 мг аденозинтрифосфата на 1 мл трис-НСl-буфера (рН 7,8), содержавшего 87 мг NaCl,

28,7 мг KCl, 52 мг MgCl<sub>2</sub> на 6H<sub>2</sub>O, и 4 мг аденозинмонофосфата на 1 мл такого же буфера, содержавшего 87 мг NaCl и 70 мг MgCl<sub>2</sub>. Выявление активности сукцинат- и лактатдегидрогеназы проводили по методу Z. Loida в собственной модификации [2].

Активность цитохромоксидазы определяли путем добавления к монослою клеток 100 мкл раствора 2 мг/мл 3,3-диаминобензидаина на основе 0,1M ацетатного буфера (рН 5,5) с 1 г MnCl<sub>2</sub> и 300 мкл 33% перекиси водорода. Активность неспецифической эстеразы анализировали по методу Хейхоу и Квалинго [5] в собственной модификации. В качестве субстратов применяли α-нафтил-AS-ацетат и синий прочный ВВ. Содержание метаболитов оксида азота – нитритов (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) – определяли посредством Griess-реактива [13]. В качестве контроля использовали образцы с добавлением ингибитора реакции – NaF (ICN), 1,5 мг/мл.

Количество продуктов реакции вычисляли по поглощению раствора на спектрофотометре Labsystem Multiscan RC (Финляндия) при соответствующих для каждого из субстратов длинах волн и выражали в виде средних величин и их стандартных ошибок. Результаты спектрофотометрического анализа активности ферментов определяли на основе унифицированного

показателя – индекса стимуляции (Т), который вычисляли по формуле:

$$T = [(No - Nk) / Nk] \times 100 \%,$$

где Nk – средний показатель оптической плотности исследуемого субстрата в интактных макрофагах; No – средний показатель оптической плотности исследуемого субстрата в стимулированных токсинами макрофагах.

#### Результаты исследования

При внесении ТЛТ и CNF происходила незначительная активация макрофагов. Под влиянием ТЛТ отрицательные (по отношению к нулевому контролю) значения активности эктоферментов плазмалеммы (АТФазы и АМФазы) наблюдались через один час инкубации ( $-3,7 \pm 0,004$  и  $-0,68 \pm 0,04 \%$ ) и вновь только через 48 часов –  $-3,7 \pm 0,004$  и  $-2,7 \pm 0,03 \%$ , соответственно (рис. 1). Схожая динамика активности упомянутых ферментов фиксировалась при внесении CNF, при этом индекс стимуляции АТФазы и АМФазы через один час составил, соответственно,  $-6,4 \pm 0,007$  и  $-2,1 \pm 0,005 \%$ , а через 48 часов –  $-7,1 \pm 0,001$  и  $-3,4 \pm 0,005 \%$  (рис. 2).

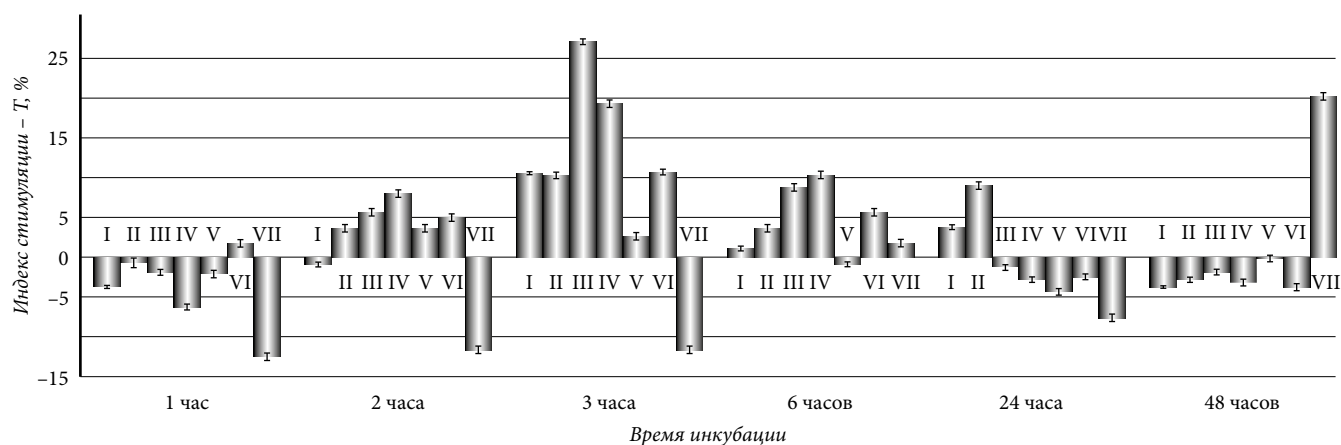


Рис. 1. Функциональная активность перитонеальных макрофагов при воздействии ТЛТ *Y. pseudotuberculosis*:

I – АТФаза, II – АМФаза, III – лактатдегидрогеназа, IV – сукцинатдегидрогеназа, V – цитохромоксидаза, VI – неспецифическая эстераза, VII – метаболиты оксида азота.

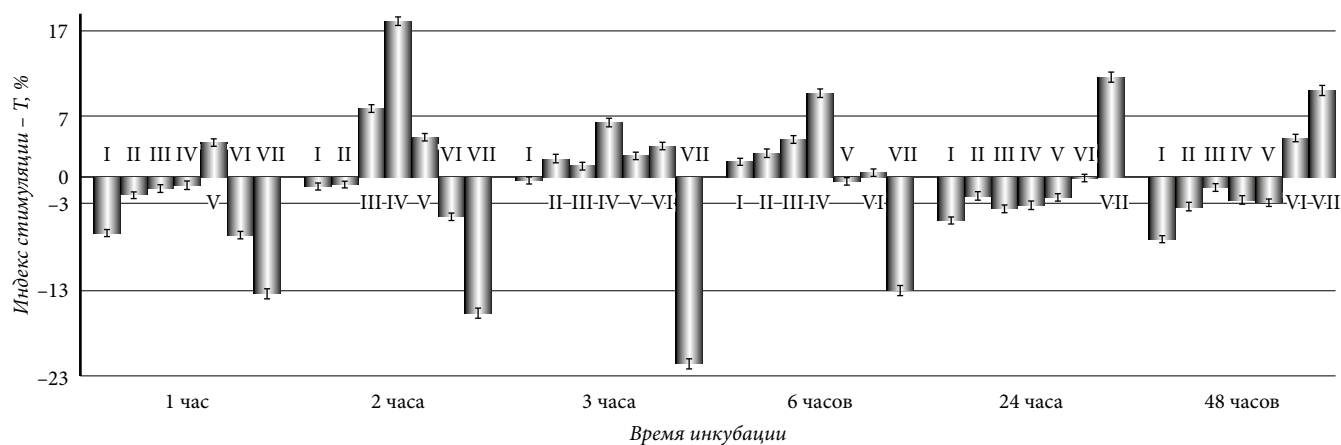


Рис. 2. Функциональная активность перитонеальных макрофагов при воздействии CNF *Y. pseudotuberculosis*:

I – АТФаза, II – АМФаза, III – лактатдегидрогеназа, IV – сукцинатдегидрогеназа, V – цитохромоксидаза, VI – неспецифическая эстераза, VII – метаболиты оксида азота.

При гистохимическом выявлении лактатдегидрогеназы может диффундировать в инкубационные среды, поэтому использованный нами метод спектрофотометрического анализа позволил более точно вычислить активность этого фермента в клетках. Было определено, что динамика выработки лактатдегидрогеназы в макрофагах после внесения ТЛТ совпадала с изменением активности сукцинатдегидрогеназы (рис. 1). Наибольшая активность указанных ферментов наблюдалась через три часа после внесения ТЛТ с последующим снижением до конца срока наблюдения. Так, через три часа инкубации значение индекса стимуляции сукцинатдегидрогеназы составило  $19,2 \pm 0,003\%$ , а лактатдегидрогеназы –  $27 \pm 0,01\%$  по сравнению с контролем (который принят за ноль). При внесении же CNF максимальные индексы стимуляции сукцинат- и лактатдегидрогеназы ( $18 \pm 0,01$  и  $8 \pm 0,002\%$ ) выявлялись через два часа (рис. 2). Эти данные свидетельствуют в пользу того, что в ответ на воздействие этих токсинов *Y. pseudotuberculosis* в макрофагах увеличивалась продукция активных форм кислорода.

Активность цитохромоксидазы возрастала в начальные сроки инкубации после внесения токсинов (через два часа) с последующим снижением с переходом в отрицательные значения до конца срока наблюдения (48 часов) вне зависимости от вида токсина.

При изучении нитроксидзависимой системы макрофагов установлено, что количество внеклеточно экскретированных метаболитов оксида азота находилось в зоне отрицательных величин, возрастая лишь к концу срока наблюдения. Так, при внесении ТЛТ содержание внеклеточных нитритов достигло максимума только через 48 часов и составило  $20,2 \pm 0,08\%$  (рис. 1), а при внесении CNF – через 24 часа и равнялось  $11,6 \pm 0,001\%$  относительно контроля, который был принят за ноль (рис. 2).

По отношению к нулевому контролю в макрофагах при внесении ТЛТ показатель активности неспецифической эстеразы возрастал на ранних сроках инкубации (через три часа) до  $10,5 \pm 0,001\%$  с последующим снижением к концу срока наблюдения до  $-3,8 \pm 0,003\%$  (рис. 1). При внесении же CNF активность этого фермента находилась в зоне отрицательных значений, возрастая лишь спустя три и затем 48 часов контакта:  $3,5 \pm 0,005$  и  $4,6 \pm 0,004\%$ , соответственно (рис. 2).

---

#### Обсуждение полученных данных

---

В ответ на вторжение инфекционных агентов, а также при взаимодействии бактерий с клетками врожденного иммунитета, включая резидентные макрофаги, в организме хозяина возникает комплекс морфофункциональных изменений [11]. Характерной особенностью метаболизма макрофагов можно назвать их способность к мгновенной активации под влиянием различных факторов экзогенного и эндогенного

происхождения. При этом преобразование этих фагоцитов из нестимулированного в стимулированное состояние связано с пространственными изменениями их цитоплазматической мембраны, о чем свидетельствует снижение активности ее эктоферментов: АМФазы и АТФазы [7]. В наших экспериментах установлено, что на макрофаги перитонеального экссудата более выраженный стимулирующий эффект оказывал CNF, на что указывали более низкие, чем для ТЛТ, концентрации экзоферментов.

В реакции преобразования активных форм кислорода принимают участие сукцинат- и лактатдегидрогеназы, которые активируются на последнем этапе гликолиза. Нами установлено, что на начальных сроках инкубации с токсинами (6 часов) в макрофагах происходила активация кислородзависимой системы, о чем свидетельствовали повышенные показатели уровней дегидрогеназ.

Y. Vi et al. [6] установили, что в макрофагах, зараженных *Y. pseudotuberculosis*, продукция нитритов ( $\text{NO}_2$ ) выявлялась через 12–24 часа после инфицирования (срок наблюдения). Это согласуется с данными, полученными в ходе нашего эксперимента. Так, под влиянием токсинов *Y. pseudotuberculosis*, количество нитритов в резидентных макрофагах достигало максимальных значений к концу срока наблюдения (24–48 часов), что можно расценивать как проявление этими клетками эффекторных функций лишь на поздних сроках инкубации.

Неспецифическая эстераза относится к лизосомальным ферментам, обеспечивающим протеолитическую и переваривающую функции фагоцитов. Изменения эстеразной активности отражают физиологическую или иммунологическую стимуляцию макрофагов, показывая способность этих клеток к восприятию различных сигналов [5]. Этот фермент обнаруживается в эндоплазматической сети, лизосомах, а также его возможными местами локализации называют митохондрии и цитоплазму клеток.

Нами обнаружено, что при внесении ТЛТ в макрофагах активность данного фермента выявлялась в начальные часы инфицирования (1–6 часов), а в последующем переходила в отрицательные значения до конца срока наблюдения (48 часов). При внесении же CNF показатели активности неспецифической эстеразы находились на протяжении всего срока наблюдения в отрицательных значениях, возрастая только через 3 и 48 часов. Повышение внутриклеточного содержания неспецифической эстеразы указывало на наличие активного метаболизма углеводов в клетках, пораженных токсинами *Y. pseudotuberculosis*, тогда как отрицательные значения – на подавление защитной реакции макрофагов в ответ на внесение токсина.

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что в течение срока наблюдения по показателям эктоферментов плазмалеммы токсины

*Y. pseudotuberculosis* (ТЛТ и CNF) оказывали слабое активирующее действие на резидентные макрофаги. Достоверная стимуляция ферментов кислородзависимой системы (лактат- и сукцинатдегидрогеназы) обнаружена лишь в отдельные сроки наблюдения (через 3–6 часов инкубации для ТЛТ и через 2–6 часов для CNF), что совпадало со слабой стимуляцией активности цитохромоксидазы в этот период. Обращало на себя внимание угнетение нитроксидобразующей системы, особенно при действии CNF: достоверная наработка метаболитов оксида азота макрофагами выявлена только в поздние сроки инкубации: через 24 и 48 часов в ответ на введение CNF и через 48 часов – в ответ на введение ТЛТ. Достоверное повышение активности неспецифической эстеразы наблюдалось лишь через 3 часа инкубации при действии ТЛТ и незначительное – через 3 и 48 часов в ответ на влияние CNF.

Следовательно, можно сделать заключение о том, что известное в литературе иммунодепрессивное действие возбудителя псевдотуберкулеза (дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки) связано с угнетением активности кислородзависимой и нитроксидзависимой бактерицидных систем макрофагов, а также их переваривающей активности в ответ на воздействие факторов патогенности *Y. pseudotuberculosis* с токсической функцией (ТЛТ и CNF). Изменения функциональной активности макрофагов в ответ на действие ТЛТ и CNF носят сходный характер и имеют лишь количественные различия, что косвенно позволяет предположить аналогичность этих токсинов.

#### Литература / References

- Исачкова Л.М., Жаворонков А.А., Антоненко Ф.Ф. Патология псевдотуберкулеза. Владивосток: Дальнаука, 1994. 190 с.  
Isachkova L.M., Zhavoronkov A.A., Antonenko F.F. Pathology of pseudotuberculosis. Vladivostok: Dalnauka, 1994. 190 p.
- Лойда З., Госсрау Р., Шиблер Т. Гистохимия ферментов: лабораторные методы. М.: Мир, 1982. 272 с.  
Loida Z., Gossrau P., Shibler T. Enzyme histochemistry: Laboratory methods. Moscow: Mir, 1982. 272 pp.
- Псевдотуберкулез / Сомов Г.П., Покровский В.И., Беседнова Н.Н. [и др.]. М.: Медицина, 2001. 254 с.  
Pseudotuberculosis / Somov G.P., Pokrovskiy V.I., Besednova N.N. [et. al.]. Moscow: Medicine. 2001. 254 p.
- Токсины *Yersinia pseudotuberculosis* / Тимченко Н.Ф., Недашковская Е.П., Долматова Л.С. [и др.]. Владивосток: Изд-во Приморского полиграфкомбината, 2004. 220 с.  
Toxins *Yersinia pseudotuberculosis* / Timchenko N.F., Nedashkovskaya E.P., Dolmatova L.S. [et. al.]. Vladivostok: Publishing house of the Primorsk Polygraph Complex. 2004. 220 pp.
- Хейхоу Ф.Г., Кваглино Д.Д. Гематологическая цитохимия. М.: Медицина, 1983. 320 с.  
Kheykhou F.G., Kvagliano D.D. Hematologic cytochemistry. Moscow: Meditsina. 1983. 320 p.
- Bi Y., Wang X., Han Y. [et al.]. *Yersinia pestis* versus *Yersinia pseudotuberculosis*: Effects on host macrophages // Scand. J. Immunol. 2012. Vol. 76, No. 6. P. 541–551.
- Bras M., Queenan B., Susin S.A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying // Biochemistry (Moscow). 2005. Vol. 70, No. 2. P. 231–239.
- Hares M.C., Hinchliffe S.J., Strong P.C. [et al.]. The *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* toxin complex is active against cultured mammalian cells // Microbiology. 2008. Vol. 154, No. 11. P. 3503–3517.
- Heine W., Beckstette M., Heroven A.K. [et al.]. Loss of CNFY toxin-induced inflammation drives *Yersinia pseudotuberculosis* into persistency // PLoS Pathog. 2018. Vol. 14, No. 2. P. e1006858. doi: 10.1371/journal.ppat.1006858.
- Lonkar P., Dedon P.C. Reactive species and DNA damage in chronic inflammation: reconciling chemical mechanisms and biological fates // Int. J. Cancer. 2011. Vol. 128, No. 9. P. 1999–2009.
- Plekhnova N.G., Somova L.M., Slonova R.A. [et al.]. Metabolic activity of macrophages infected with hantavirus, an agent of hemorrhagic fever with renal syndrome // Biochemistry (Moscow). 2005. Vol. 70, No. 9. P. 990–997.
- Sadana P., Mönnich M., Unverzagt C., Scrima A. Structure of the *Y. pseudotuberculosis* adhesin Invasin E // Protein Sci. 2017. Vol. 26, No. 6. P. 1182–1195.
- Schulz K., Kerber S., Kelm M. Reevaluation of the Griess method for determining NO/NO<sub>2</sub>– in aqueous and protein-containing samples // Nitric. Oxide. 1999. Vol. 3, No. 3. P. 225–234.
- Schweer J., Kulkarni D., Kochut A. [et al.]. The cytotoxic necrotizing factor of *Yersinia pseudotuberculosis* (CNFY) enhances inflammation and Yop delivery during infection by activation of Rho GTPases // PLoS Pathog. 2013. Vol. 9, No. 11. P. e1003746. doi:10.1371/journal.ppat.1003746.
- Spinner J.L., Seo K.S., O'Loughlin J.L. [et al.]. Neutrophils are resistant to *Yersinia YopJ*/P-induced apoptosis and are protected from ROS-mediated cell death by the type III secretion system // PLoS One. 2010. Vol. 5, No. 2. P. e9279. doi: 10.1371/journal.pone.0009279.

Поступила в редакцию 18.09.2018.

#### EFFECT OF YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS TOXINS ON THE REACTIVITY OF INNATE IMMUNITY CELLS

I.N. Lyapun, E.I. Drobot, L.M. Somova, E.K. Psareva, N.F. Timchenko

Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russian Federation)

**Objective.** The effect of thermolabile lethal toxin (TLT) and cytotoxic necrotizing factor (CNF) *Yersinia pseudotuberculosis* was studied on the enzymatic activity of peritoneal macrophages.

**Methods.** The subjects of the study were TLT and CNF proteins isolated from *Y. pseudotuberculosis* 2517, III serovar strain (obtained from H. Mollaret, France). The primary culture of macrophages was obtained from peritoneal exudate of guinea pigs. We studied enzymes: 5'-nucleotidase, ATPase, lactate dehydrogenase, succinate dehydrogenase, cytochrome oxidase, nonspecific esterase, NO metabolites – nitrite.

**Results.** Under the influence of TLT and CNF toxins, peritoneal macrophages were stimulated, as evidenced by low values of ectoenzymes. At the same time, under the influence of these toxins in phagocytes, stimulation of the oxygen-forming system enzymes was detected at the initial incubation times (1–6 h), and the stimulation of NO metabolites was at the end of the observation period. Against the background of increased activity of lysosomal enzymes (nonspecific esterase) in macrophages infected with TLT, the inhibition of lysosome functions was detected under the action of CNF toxin, which indicated suppression of the digestive capacity of phagocytes.

**Conclusions.** CNF toxin of *Y. pseudotuberculosis* exerts a more pronounced cytotoxic effect on macrophages than TLT, as evidenced by activity induced of oxygen and nitroxide-forming systems, and low values of lysosomal enzymes.

**Keywords:** *pseudotuberculosis*, thermolabile lethal toxin, cytotoxic necrotizing factor, macrophages