

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

Л.М.Сомова¹, Ф.Н.Шубин¹, Е.И.Дробот¹, Н.Г.Плехова^{1,2}, И.Н.Ляпун¹**ПЛАЗМИД-АССОЦИИРОВАННАЯ ВИРУЛЕНТНОСТЬ YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS И ИНФЕКЦИОННЫЙ ПРОЦЕСС**¹НИИ эпидемиологии и микробиологии, ²Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток

Обобщены данные литературы, касающиеся генетически детерминированных факторов патогенности *Y. pseudotuberculosis* и ассоциированных с ними проявлений этой инфекции. вызываемой разными плазмидными типами возбудителя. Основное внимание обращено на особенности клеточно-тканевых изменений, опосредованных плазмидой вирулентности pYV, а также эффекты патогенности мало изученной плазмиды pVM82, имеющейся только в штаммах *Y. pseudotuberculosis*, вызывающих клинико-эпидемическое проявление инфекции в виде дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки (ДСЛ). Полученные данные о способности дальневосточных штаммов продуцировать суперантиген YPMa, *Y. pseudotuberculosis*-производный митоген А, вероятно, свидетельствуют о том, что он играет ключевую роль в патогенезе ДСЛ. Вариабельность повреждений клеток врожденного иммунитета и органов-мишеней, вызываемых различными по вирулентности плазмидными типами *Y. pseudotuberculosis*, может обуславливать полиморфизм клинико-морфологических проявлений этой инфекции. Углубленное понимание зависимости механизмов иммунопатогенеза болезни от молекулярной характеристики возбудителя раскрывает перспективы совершенствования диагностики и прогнозирования тяжести течения псевдотуберкулеза и в целом иерсиниозов у человека.

Журн. микробиол., 2016, № 6, С. 74—85

Ключевые слова: дальневосточная скарлатиноподобная лихорадка (ДСЛ), *Y. pseudotuberculosis*, плазмидные типы, плазмид-ассоциированная вирулентность, нейтрофилы, макрофаги

L.M.Somova¹, F.N.Shubin¹, E.I.Drobot¹, N.G.Plekhova^{1,2}, I.N.Lyapun¹**PLASMID-ASSOCIATED VIRULENCE OF YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS AND INFECTIOUS PROCESS**¹Research Institute of Epidemiology and Microbiology, ²Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia

Literature data regarding genetically determined pathogenicity factors of *Y. pseudotuberculosis* and associated manifestations of this infection caused by various plasmid types of the causative agent are generalized. Principal attention is given to features of cell-tissue alterations mediated by virulence plasmid pYV, as well as effects of pathogenicity of an understudied pVM82 plasmid present only in *Y. pseudotuberculosis* strains causing clinical-epidemic manifestation of the infections as Far East scarlet-like fever (FESLF). The data obtained on the ability of far-eastern strains to produce YPMa super-antigen, *Y. pseudotuberculosis*-derivative mitogen A, probably give evidence on its key role in FESLF pathogenesis. Variability of damage of innate immunity cells and target-organs caused by various plasmid types of *Y. pseudotuberculosis* by virulence could determine polymorphism of clinical-morphological manifestations of this infection. In-depth understanding of dependency of immune pathogenesis mechanisms of the disease on molecular characteristics of the causative agent opens up perspectives of enhancement of diagnostics and prognosis of the severity of the course of pseudotuberculosis and yersiniosis in human in general.

Key words: Far East scarlet-like fever (FESLF), *Y. pseudotuberculosis*, plasmid types, plasmid-associated virulence, neutrophils, macrophages

Актуальность изучения инфекций, вызываемых бактериями рода *Yersinia* (иерсиниозов), обусловлена их принадлежностью к эмерджентным болезням, возбудители которых вызывают генерализованные формы заболевания человека, в определенных условиях принимающие вспышечный и групповой характер. Пристальное внимание исследователей к проблеме иерсиниозов с начала XXI века связано с возросшей угрозой биотерроризма во всем мире, а также с потенциальной способностью гетерогенных популяций патогенных микроорганизмов к реверсии их вирулентных свойств, ассоциированных с изменениями на геномном уровне. Для понимания потенциала патогенности бактерий рода *Yersinia* важное значение имеет факт, что возбудитель псевдотуберкулеза, *Y. pseudotuberculosis*, является эволюционным предшественником этиологического агента чумы, *Y. pestis* [17].

Освещая новые данные о комплексе *Yersinia pseudotuberculosis*, авторы [37; 42] сообщают о мономорфном кладе (clade), вызвавшем дальневосточную скарлатиноподобную лихорадку (Far East scarlet-like fever, FESLF) в СССР в 1960 году, который, по мнению авторов, часто претерпевает рекомбинацию, возможно, из-за конъюгативной плазмиды pVM82 и содержит белок вирулентности TspYI. Этот ранее неизвестный белок вирулентности, ответственный за уникальный клинический синдром FESLF, имеет значительную гомологию последовательности к членам семейства Toll/IL-1 рецептора (TIR). Бактериальный TIR домен содержит белки (Tcps), действующие на иммунную систему по TIR-TIR взаимодействиям, и подрывает защитные реакции организма с помощью многогранных механизмов. Белок TspYI увеличивает внутриклеточное выживание штаммов *in vitro* и в селезенки мышей на модели перитонита, участвует в торможении фагоцитоза даже тех штаммов *Y. pseudotuberculosis* группы FESLF, где плазида вирулентности pYV отсутствует.

В настоящее время *Y. pseudotuberculosis* как представитель патогенных иерсиний привлекает внимание исследователей всего мира в качестве модели для раскрытия молекулярных механизмов взаимодействия в системе микроорганизм-клетка хозяина. Недавно доказано, что клинико-эпидемическое проявление псевдотуберкулеза, первоначально названного дальневосточной скарлатиноподобной лихорадкой (ДСЛ) [8, 15], связано с конкретной клональной линией *Y. pseudotuberculosis*, характеризующейся определенным плазмидным профилем (pVM82, pYV 48), сиквенстипом (2ST) и аллелем гена *yadA* (1 аллель) [Тимченко Н.Ф. и др., 2011].

Большой интерес мировой науки и здравоохранения к проблеме псевдотуберкулеза, протекающего в виде дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки, демонстрирует недавно опубликованный обзор A. Amphlett (2015). Этот эпидемический вариант болезни, наблюдаемый прежде всего в России и Японии, протекает с серьезными системными воспалительными симптомами. В России *Y. pseudotuberculosis* инфекция признана как национальная проблема здоровья и дополнена к национальной системе нотификации (уведомления) в 1988 году [47]. В Японии эпидемии *Y. pseudotuberculosis* инфекции, именуемой как Izumi лихорадка и синдром Кавасаки, стали регистрироваться с 1977 г. [41, 48].

Патогенные для человека *Y. pseudotuberculosis* обладают широким набором факторов патогенности, детерминируемых хромосомными и плазмидными генами [6]. У различных штаммов *Y. pseudotuberculosis* обнаружено 11 типов внехромосомных генетических элементов — плазмид, имеющих молекулярную массу (м.м.) от 2 до 82 МДа. Наиболее постоянными являются плазмиды рYV м.м. 42 — 48 МДа и рVM82 м.м. МДа, что позволило отнести их к категории основных, а остальные — к дополнительным.

Заболееваемость в виде эпидемических вспышек могут обуславливать доминирующие плазмидные типы — рYV 48 и рYV 48: рVM 82, содержащиеся в геноме основного этиологического агента псевдотуберкулеза у людей в Сибири и на Дальнем Востоке — *Y. pseudotuberculosis* 1 серовара [9]. При этом для одноплазмидного варианта *Y. pseudotuberculosis*, содержащего плазмиду вирулентности рYV м.м. 45 — 48 МДа, характерны вспышки с более благоприятным течением, преобладанием легких и стертых форм заболевания. Присутствие дополнительной плазмиды рVM 82 в штаммах *Y. pseudotuberculosis* (рYV48: рVM82) обуславливает более тяжелое клиническое течение заболевания с полиорганной патологией.

Присутствие плазмиды вирулентности PUV является необходимым условием для патогенности видов *Yersinia*. По наличию или отсутствию этой плазмиды штаммы разделены на патогенные (G1-G3, G5-G6) и непатогенные подгруппы (G4) [Amphlett A., 2015]. Подгруппы G2 и G3 составляют большинство клинических изолятов, а подгруппы G1, G2 и G6 включают меньшинство штаммов. Наиболее частым клиническим генотипом в России и Японии является G3, обладающий PUV и продуцирующий суперантигенный токсин YPMa, но не имеющий острова высокой патогенности HPI [28].

Патологическое значение суперантигена YPMa обуславливается его способностью связываться непосредственно с молекулами МНС класса II, активируя Т-клетки так быстро, как обычные антигены активируют врожденные иммунные клетки [29], а также взаимодействуя с множеством Т-клеток, содержащих элементы V β : V β 3, V β 9, V β 13.1 и V β 13.2, и активируя от 5 до 20% от всей популяции Т-клеток [50].

Механизм, посредством которого YPMa вызывает развитие заболевания ДСЛ, вероятно, будет многофакторный [Amphlett A., 2015]. Исследования, в которых вводили очищенный YPMa подкожно мышам, показали, что токсический шок не происходит, когда были использованы моноклональные антитела против TNF- γ , IFN- γ или CD4, поскольку эти цитокины и Т-клеточный подтип вовлекаются в патогенез синдрома YPMa — индуцированного токсического шока [35]. Кроме того, было показано, что суперантигены потенцируют токсичность эндотоксинов, таких как липополисахарид, и это синергетическое действие может дополнительно способствовать развитию заболевания [20].

Большинство дальневосточных штаммов *Y. pseudotuberculosis* продуцируют YPMa, но не все случаи *Y. pseudotuberculosis* инфекции сопровождаются развитием картины ДСЛ, предполагая взаимодействие между суперантигеном и другими факторами вирулентности. Секвенирование генома штамма, вызывающего ДСЛ, показало, помимо рYV, дополнительные факторы вирулентности, которые могут быть вовлечены в патогенез заболевания [25]. Эти геномные элементы включают в себя следующее: плазмиды рVM82, *Yersinia* адгезии остров патогенности (YAPI), который кодирует пили типа IV.

Нами впервые изучен плазмидный профиль 791 штаммов *Y. pseudotuberculosis* серовара 1, изолированных в 1977 — 1985 гг. от больных людей, диких

животных, из смывов с продуктов и оборудования овощехранилищ в различных регионах страны [14]. Плазмиды выявлены у 784 (99,1%) штаммов, и они имели молекулярные массы (в МДа): 82; 45; 57; 5,5; 4,4; 3,5; 2,7; 2,4; 2,3 (по уточненным данным плазида р45 имеет массу 48 МДа). Среди этих плазмид наиболее часто выявляемыми были элементы массой 48 и 82 МДа, изучение которых показало, что плазида массой 48 МДа является плазмидой вирулентности *Y. pseudotuberculosis* (pYV), а плазида 82 МДа является специфичной для штаммов *Y. pseudotuberculosis* и была обозначена как pVM82. В соответствии с плазмидными характеристиками штаммы *Y. pseudotuberculosis* были дифференцированы на 15 плазмидных типов. Наиболее часто выявляемыми были штаммы 82:48 МДа, а также штаммы, содержащие обе указанные плазмиды в комбинации с низкомолекулярными элементами (677 штаммов, 86,4%). Вторыми по частоте встречаемости были штаммы плазмидного типа 48:4,4 МДа (9,3%).

Близкие результаты получены при изучении плазмидной характеристики 212 штаммов *Y. pseudotuberculosis*, выделенных из различных источников в 2000 — 2010 гг. [47]. При этом на территориях Сибири и Дальнего Востока выявлена циркуляция шести плазмидных типов: 82:47 МДа (62,1%), 47 МДа (31,1%) и только 6,8% остальных типов: 82:47:17 МДа (5,3%), 110:82:47:17 МДа (0,5%), 82:47:17:2.7 МДа (0,5%); 82:47:2.7 МДа (0,5%). В дополнение к наличию плазмиды вирулентности pYV и плазмиды pVM82 штаммы *Y. pseudotuberculosis*, изолированные от пациентов, содержали суперантиген YPMa независимо от тяжести заболевания. В период с 2000 по 2010 гг. общее среднее число вновь зарегистрированных случаев было 6024 в год, а средняя частота составила 4,2 на 100 000 населения.

Детально охарактеризованы факторы патогенности, детерминированные хромосомными генами [13]. Они включают: 1) инвазин — белок молекулярной массой 103 kDa, обеспечивающий температура-зависимое проникновение бактерий в клетки хозяина; 2) белок Ail молекулярной массой 17 kDa, действующий как вторичный фактор адгезии и инвазии уже после адаптации бактерий к температуре тела хозяина; 3) антиген рН6, экспрессирующийся при температуре 37°C и низком значении рН; 4) белок молекулярной массой 21 kDa, экспрессирующий образование фимбрий. Хромосомные гены играют критическую, хотя еще не совсем определенную роль в патогенезе иерсиниозной инфекции [19].

Считают, что развитие инфекционного процесса, связанное с активным размножением *Yersinia* внутри тканей, возможно только при наличии у них гомологичной плазмиды вирулентности, называемой PCD1 у *Y. pestis*, и pYV (plasmid for *Yersinia* virulence) у *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* молекулярной массой 42 — 48 МДа, которая придает содержащим ее штаммам устойчивость к действию иммунной системы человека или животных [13, 21, 22, 39].

Плазида вирулентности pYV кодирует белок наружной мембраны Yad A, являющийся ведущим адгезином иерсиний, а также 7 разновидностей эффекторных белков наружной мембраны Yops, которые представляют собой комплекс факторов, предназначенных для нейтрализации иммунокомпетентных клеток и осуществляющих запуск апоптоза макрофагов [21, 23, 36, 39, 43, 46, 51], а также запускающих систему секреции III типа (type III secretion system, T3SS) [23]. T3SS является общей для всех патогенных *Yersinia* и позволяет бактериям вводить синтезируемые ими эффекторные белки в цитоплазму клетки хозяина без проникновения в нее, что играет существенную роль в развитии иерсиниозных инфекций.

Эффекторный белок YopE является GTPазным активирующим белком, а YopH — протеин тирозинфосфатазой, оба являются антифагоцитарными. YopO/YpkA является серин треонин киназой. YopM может переходить к ядру клетки-хозяина. YopJ/P ингибирует продукцию провоспалительного цитокина TNF- α и индуцирует апоптоз макрофагов. YopT является цитотоксином, который вызывает нарушение актиновых филаментов. Было показано, что все Yops дополнительно разрывают внутриклеточную передачу сигнала или приводят к изменениям цитоскелета, что препятствует фагоцитозу [24]. PLYV также кодирует белки, участвующие в контроле и транслокации эффекторных Yops к клетке-мишени: YopN, YopB, YopD, YaeA, IcrG и IcrV. Патогенные виды *Yersinia* преимущественно нацелены на клетки врожденной иммунной системы (нейтрофилы, макрофаги и дендритные клетки) для инъекции Yops, ослабляя врожденный иммунный ответ [32].

Большой интерес представляет гораздо менее изученная плаزمид с молекулярной массой 82 МДа (pVM82), обнаруживаемая только у штаммов *Y. pseudotuberculosis* I серовара, который является наиболее частым этиологическим агентом ДСЛ у человека в России и не встречается у других представителей рода *Yersinia*. Наличие у этих бактерий двух плазмид молекулярной массой 82 и 45 — 48 МДа детерминируют особую вирулентность штаммов и вызывают более тяжелое течение заболевания [14]. Авторами установлено, что наличие только плазмиды PLYV определяет спорадическую заболеваемость псевдотуберкулеза. Кроме того, ими показано, что среди природных штаммов *Y. pseudotuberculosis* встречается плаزمида p57 молекулярной массой 57 МДа, которая не коррелирует с эпидемичностью штаммов и является фрагментом плазмиды pVM82 вместе с фрагментом ДНК в 25 МДа. Было установлено [1], что в присутствии плазмиды pVM82 подавляется образование антител к ряду основных антигенов *Y. pseudotuberculosis*, в то же время, штаммы, содержащие плазмиду p57, такого эффекта не оказывают. Поэтому был сделан вывод, что фрагмент ДНК в 25 МДа детерминирует синтез дополнительного фактора патогенности возбудителя псевдотуберкулеза.

После проникновения в организм патогенных бактерий инициируется сложный каскад событий, в котором ключевая роль отводится клеткам врожденного иммунитета [33, 44]. Понимание закономерностей реагирования этих клеток (нейтрофилов, моноцитов/макрофагов) при взаимодействии с гетерогенными популяциями иерсиний может иметь важное значение при разработке основ вакцинальной стратегии населения в группах риска, что особенно необходимо для предотвращения эпидемий чумы. Сведения о закономерностях реагирования клеток врожденного иммунитета как первой линии защиты при инфекционных процессах при их взаимодействии с разными плазмидными типами *Y. pseudotuberculosis* остаются недостаточно изученными и противоречивыми.

Нами впервые детально прослежена ферментативная активность клеток врожденного иммунитета при инфицировании разными плазмидными типами *Y. pseudotuberculosis*. На моделях *in vivo* и *in vitro* установлены качественные и количественные различия реагирования клеток врожденного иммунитета (нейтрофилов и макрофагов), включая кислородзависимые, кислороднезависимые и нитроксидзависимые механизмы бактерицидности [3]. В ответ на заражение *in vitro* слабовирулентным плазмидным типом pVM82 *Y. pseudotuberculosis* более активно реализовался бактерицидный потенциал (показа-

тели фагоцитоза и бактерицидности) и нитроксидобразующая активность фагоцитов, а также защитная реакция миелопероксидазы нейтрофилов, по сравнению с вирулентным плазмидным типом рYV48: рVM82. При одинаковой бактериальной нагрузке (1:10) фагоцитарная активность нейтрофилов была ниже, чем у макрофагов, при этом активнее поглощался и обезвреживался менее вирулентный плазмидный тип рVM82 Y. pseudotuberculosis, тогда как вирулентный тип рYV48: рVM82 оказывал цитотоксическое действие на клетки. В ранние сроки (1,5 — 2 часа) после заражения плазмидным типом рYV45: рVM82 Y. pseudotuberculosis уровень активности ферментов кислород-зависимой системы (НСТ-тест, СДГ) нейтрофилов превышал таковой после инфицирования плазмидным типом рVM82. Активность миелопероксидазы, принимающей участие в защитной реакции нейтрофилов, и продукция катионных белков были выше в отношении менее вирулентного плазмидного типа рVM82 Y. pseudotuberculosis.

Полученные нами данные согласуются с результатами исследований Ж.А. Коноваловой [5], показавшей, что плазмидсодержащие Y. pseudotuberculosis (рYV48 и рYV48:рVM82) более устойчивы к разрушению макрофагами и нейтрофилами, чем клетки бесплазмидного штамма. Активность ферментов «окислительного взрыва» (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, НАДФ-Н-оксидазы), супероксиддисмутазы, миелопероксидазы и кислой фосфатазы в макрофагах при фагоцитозе бесплазмидных клеток была выше, чем в случае плазмидсодержащих бактерий.

Таким образом, установленные особенности метаболической активности в макрофагах и нейтрофилах, инфицированных разными плазмидными типами Y. pseudotuberculosis, свидетельствуют об угнетении бактерицидной способности фагоцитов, что имеет существенное значение в иммунопатогенезе данной инфекции.

Ключевая роль в развитии патологического процесса при инфекционных заболеваниях принадлежит повреждению клеток, которое зависит от степени вирулентности инфицирующих агентов. В органопатологии псевдотуберкулеза, вызываемого вирулентными штаммами Y. pseudotuberculosis, содержащими плазмиды рYV: рVM82, значительное место занимают деструктивно-воспалительные изменения с формированием своеобразных «абсцессоподобных или некротических очажков», а также гранулем (узелков) с так называемым центральным кариорексисом, которые являются отличительным морфологическим признаком псевдотуберкулеза [4, 16].

Получены данные о вариабельности клеточных повреждений в гистопатологии псевдотуберкулеза в зависимости от плазмид-ассоциированной вирулентности Y. pseudotuberculosis [3, 10]. Установлено, что при заражении животных как высоко вирулентным двухплазмидным штаммом рYV48: рVM82, так и штаммом Y. pseudotuberculosis со сниженной вирулентностью, имеющим единственную плазмиду рVM82, в органах-мишенях развивались клеточные повреждения как по типу некроза, так и апоптоза. В ответ на заражение плазмидным типом рVM82 наблюдалось преобладание апоптоза в органопатологии инфекции. Вирулентный штамм Y. pseudotuberculosis, содержащий две плазмиды рYV48 : рVM82, преимущественно вызывал некроз фагоцитов. На модели in vitro выявлено его апоптоз-индуцирующее действие на клетки врожденного иммунитета, причем в большей степени нейтрофилов, чем макрофагов. Максимальное количество апоптотических нейтрофилов наблю-

далось на 7 день после заражения ($45 \pm 3,3\%$). Апоптоз макрофагов обнаружен на 2 день после контакта с бактериями ($29 \pm 3\%$). Кроме некроза и апоптоза нейтрофилов при воздействии плазмидного типа pYV48 : pVM82 *Y. pseudotuberculosis* обнаружен 3 тип клеточной гибели — образование внеклеточных ловушек [3]).

Поглощение *Yersinia* дикого типа, содержащего плазмиду pYV, индуцирует форму гибели нейтрофилов, называемую фагоцитоз-индуцированной гибелью клеток (PICD), что зависит от продукции активных форм кислорода (АФК) и имеет важное значение для разрешения инфекции и воспаления [40, 46]. Контролируемый уровень апоптоза иммунных клеток требуется для вирулентности *Yersinia* [21].

Исходя из того, что нейтрофилы тесно связаны с острым воспалением, J.L. Spinner et al. [46] исследовали роль белков *Yersinia* YopJ и YopP, связанных с плазмидой pYV, в определении судьбы человеческих нейтрофилов. При использовании *in vitro* штаммов *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* и *Y. pestis* дикого типа и мутантных по плазмиде вирулентности штаммов было установлено, что YopJ / YopP-опосредованная индукция апоптоза не происходит в нейтрофилах в отличие от макрофагов. Надежная продукция нейтрофилами АФК в ответ на дефицитные по плазмиде вирулентности штаммы *Yersinia* была связана с повышенной клеточной гибелью, предположили, что опосредованное иерсиниями ингибирование продукции АФК нейтрофилами играет роль в уклонении от врожденного иммунитета человека, в частности, за счет ограничения апоптоза нейтрофилов. При этом редукция апоптоза нейтрофилов потенциально задерживала острую воспалительную реакцию и способствовала персистенции *Yersinia* посредством внутриклеточной и внеклеточной выживаемости в очаге инфекции [38, 45]. Эти данные демонстрируют, что увеличенная цитотоксичность/апоптоз иммунных клеток соответствует аттенуации вирулентности *Yersinia*.

Иерсинии способны индуцировать Yop-опосредованный апоптоз клеток лимфоидной ткани [53], в том числе макрофагов [34]. Это может иметь значение в процессе инфекции, когда включение механизма апоптоза у макрофагов хозяина приводит к их инактивации и тем самым к исключению воспалительного ответа, что, в свою очередь, приводит к внеклеточному размножению патогена в лимфоидной ткани. *Yersinia*, экспрессирующие YopP, оказывают сильное цитотоксическое действие на мышинные макрофаги и дендритные клетки, чем те, которые экспрессируют YopJ, тем не менее, различия аминокислотных последовательностей между YopJ и YopP обуславливают менее эффективное перемещение YopJ в клетки хозяина [21, 49]. Кроме того, *Yersinia*, конструированные для экспрессии YopP (вместо YopJ), являются менее патогенными для мышей при оральной и подкожной инфекции.

Ацетилтрансферазная активность белка YopJ, опосредованная плазмидой вирулентности pYV, способствует разным формам гибели клеток, которая может проявляться в виде апоптоза, пироптоза и некроза [27, 31]. Важно отметить, что различные реакции организма хозяина являются следствием доставки соответствующего эффекторного «коктейля»: YopJ (P) *Y. enterocolitica* транслоцируется в клетки хозяина более продуктивно и цитотоксично, чем YopJ аллели, экспрессируемые *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* [49]. Замена YopJ *Y. pseudotuberculosis* на более цитотоксический YopJ (P) *Y. enterocolitica* ослабляет течение псевдотуберкулезной инфекции [21]. Таким образом, было по-

казано, что белок YopJ не является важным для патогенеза *Yersinia* инфекции, хотя это остается спорным.

Воспалительный пироптоз, развивающийся при воздействии на макрофаги полисахарида бактерий рода *Yersinia*, может протекать как в присутствии, так и в отсутствии АТФ. Пироптоз опосредован адаптерным белком ASC, который вместе с каспазой-1 образует надмолекулярный цитоплазматический комплекс, также известный как пироптосома [26]. Это требует плазмид-кодированных T3SS, но не YopJ или любых других известных эффекторных молекул [18]. Пироптоз является результатом активации каспазы-1, которая функционально отличается от структурно родственных апоптотических каспаз. Каспаза-1 зависимое повреждение ДНК происходит по механизму пироптоза, отличающемуся от каспаза-3 зависимого расщепления ДНК в клетках при апоптозе [18, 19]. Каспаза-1 также стимулирует созревание и секрецию воспалительных цитокинов IL-1 и IL-18, что вызывает образование пор в плазматической мембране, патологических потоков ионов, которые приводят к отеку клетки и, в конечном счете, к лизису и высвобождению воспалительного внутриклеточного содержимого, что служит усилению физиологического воздействия воспалительных цитокинов.

Установлено, что макрофаги, подвергающиеся пироптозу, не только демонстрируют морфологические признаки, типичные для апоптоза, но и обладают некоторыми чертами, ассоциированными с некрозом [30]. Интересно, что *Yersinia*-инфицированные клетки проявляют особенности апоптоза, пироптоза или некроза в зависимости от состояния и типа вовлеченных клеток [18, 52]. Однако остается неясным — содействует ли клеточная гибель защите организма хозяина и можно ли рассматривать ее как стратегию для *Yersinia* элиминировать фагоциты, или наоборот, способствует ли клеточная гибель иммунитету против иерсиний [20].

Токсины как факторы патогенности бактерий играют важную роль в инициации, развитии и исходе инфекционных болезней. К началу 2000-х годов было сформировано представление о спектре токсинов *Y. pseudotuberculosis* и раскрыты некоторые механизмы реализации токсического эффекта патогена [12]. Существенное значение в патогенезе псевдотуберкулеза имеют два токсина *Y. pseudotuberculosis* — термолабильный летальный токсин (ТлТ) и термостабильный летальный токсин (ТсТ).

Термолабильный токсин *Y. pseudotuberculosis* — видовой белок с м.м. 200 кДа, обладающий иммуногенными и аллергенными свойствами, способен вызывать у лабораторных животных местную дермонекротическую реакцию и смерть при парентеральном введении. ТлТ выделен Н.Ф. Тимченко из штамма 2517 III серовара, содержащего плазмиду pYV 48 MDa (штамм получен от Н. Mollaret, Франция), а также из бесплазмидного штамма. Установлено [7] дозозависимое селективное действие этого токсина на функциональную активность клеток врожденного иммунитета. При его добавлении к нейтрофилам в концентрации 1,52 мкг/мышь (5 LD₅₀) выявлена активация ферментов кислород-зависимой системы (ЛДГ и МПО) в ранний период контакта (до 3 часов). В свою очередь, было отмечено увеличение количества апоптотических макрофагов в ранние сроки контакта с ТлТ (5 часов) и его дальнейшее увеличение в течение срока наблюдения с одновременным увеличением активности митохондриального фермента цитохромоксидазы и продукции оксида азота. Патоморфологические исследования показали [11], что этот токсин имеет

непосредственное отношение к развитию инфекционно-токсического шока при псевдотуберкулезе.

Термостабильный летальный токсин — белок м.м. 45 кДа, который продуцируют 82,6% штаммов *Y. pseudotuberculosis* I — VI сероваров, выделенных от больных людей и из внешней среды [12]. Продукция токсина наблюдается у бактерий, несущих как плазмиду вирулентности *pYV*, так и в сочетании с плазмидой *pVM82*, а также у бесплазмидных бактерий, что предполагает хромосомную детерминированность *TcT* у возбудителя псевдотуберкулеза. Этот токсин оказывал концентрационно-зависимое действие на активность антиоксидантных ферментов (каталазы, глутатионредуктазы), апоптоз и жизнеспособность нейтрофилов крови крыс, причем развитие апоптоза происходило на фоне повышения активности указанных ферментов [2].

Таким образом, начиная с 2000 годов, значительно повысился интерес к дальневосточной скарлатиноподобной лихорадке, регистрирующейся в основном в России и Японии. Это своеобразное клиническо-эпидемическое проявление псевдотуберкулезной инфекции человека, известное с 1959 г., является генерализованным воспалительным заболеванием с полиорганной патологией, отличающимся от спорадической *Y. pseudotuberculosis* инфекции в Европе, протекающей в форме гастроэнтерита. Лишь в течение последних 10 лет были идентифицированы ДСЛ-ассоциированные геномные элементы *Y. pseudotuberculosis*, включающие плазмиды *pYV* и *pVM82*, кодирующие спектр факторов патогенности возбудителя. Установлена способность дальневосточных штаммов, одновременно несущих обе плазмиды, продуцировать суперантиген *YPMa*, *Y. pseudotuberculosis*-производный митоген *A*, играющий, вероятно, ключевую роль в патогенезе ДСЛ. Однако эффекты этого токсина и его взаимодействие с другими факторами вирулентности и иммунологической защиты организма хозяина еще недостаточно раскрыты. Вариабельность реагирования клеток врожденного иммунитета и форм повреждения клеток органов-мишеней, вызываемых различными по вирулентности плазмидными типами *Y. pseudotuberculosis*, может лежать в основе полиморфизма клинико-морфологических проявлений вызываемой ими инфекции, что требует дальнейших исследований на основе современных методических подходов. В конечном итоге, углубленное понимание зависимости механизмов иммунопатогенеза болезни от молекулярной характеристики возбудителя раскрывает перспективы усовершенствования диагностики и прогнозирования тяжести течения псевдотуберкулеза и в целом иерсиниозов у человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гинцбург А.Л., Шубин Ф.Н., Шовадаева Г.А. Новый признак патогенности, кодируемый плазмидой *pVM82* *Yersinia pseudotuberculosis*. Генетика. 1988, 24 (9): 1562-1571.
2. Долматова Л.С., Заика О.А., Недашковская Е.П., Тимченко Н.Ф. Исследование механизмов апоптоз-модулирующего влияния термостабильного токсина *Yersinia pseudotuberculosis* и корригирующего действия экстракта из дальневосточных видов голотурий на нейтрофилы крыс *in vitro*. Тихоокеанский медицинский журнал. 2010, 3: 76-80.
3. Дробот Е.И. Реактивность клеток врожденного иммунитета при инфекции, вызванной разными плазмидными вариантами *Y. pseudotuberculosis*: Автореф. дис. канд. биол. наук. Владивосток, 2015.
4. Исачкова Л.М., Жаворонков А.А., Антоненко Ф.Ф. Патология псевдотуберкулеза. Владивосток, Дальнаука, 1994.
5. Коновалова Ж.А. Бактерицидные механизмы фагоцитоза *Y. pseudotuberculosis* с разным набором плазмид: Автореф. дис. канд. биол. наук. Иркутск, 2002.

6. Литвинова Л.В., Ценева Г.Я., Иващенко А.П. и др. Генетические особенности *Yersinia pseudotuberculosis* и эпидемиологические черты групповых заболеваний псевдотуберкулезом в организованных коллективах. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2009, 3: 31-34.
7. Плехова Н.Г., Дробот Е.И., Тимченко Н.Ф. и др. Влияние термолабильного токсина *Yersinia pseudotuberculosis* на функции клеток врожденного иммунитета. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2014, 157 (4): 483-487.
8. Сомов Г.П. Дальневосточная скарлатиноподобная лихорадка. М., Медицина, 1979.
9. Сомов Г.П., Покровский В.И., Беседнова Н.Н., Антоненко Ф.Ф. Псевдотуберкулез. М., Медицина, 2001.
10. Сомова Л.М., Плехова Н.Г., Дробот Е.И. Новые аспекты патологии псевдотуберкулеза. Архив патологии. 2012, 74 (3): 60-64.
11. Сомова Л.М., Плехова Н.Г., Дробот Е.И. и др. Патоморфологические изменения при экспериментальной токсемии, вызванной термолабильным токсином *Yersinia pseudotuberculosis*. Тихоокеанский медицинский журнал. 2010, 3: 65-67.
12. Тимченко Н.Ф., Недашковская Е.П., Долматов Л.С., Сомова-Исачкова Л.М. Токсины *Yersinia pseudotuberculosis*. Владивосток, Приморский полиграфкомбинат, 2004.
13. Ценева Г.Я., Солодовникова Н.Ю., Воскресенская Е.А. Молекулярные аспекты вирулентности иерсиний. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2002, 3: 248-266.
14. Шубин Ф.Н., Гинцбург А.Л., Китаев В.М. и др. Анализ плазмидного состава штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* и его применение для типирования возбудителя псевдотуберкулеза. Молекулярная генетика, микробиология, вирусология. 1989, 6: 20-25.
15. Шубин Ф.Н., Сибирцев Ю.Т., Рассказов В.А. Плазмиды *Yersinia pseudotuberculosis* и их значение в реализации эпидемического процесса при псевдотуберкулезе. Журн. микробиол. 1985, 12: 53-56.
16. Шурыгина И.А., Чеснокова М.В., Климов В.Т. и др. Псевдотуберкулез. Новосибирск, Наука, 2003.
17. Achtman M., Zurth K., Morelli C. et al. *Yersinia pestis*, a cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999, 96: 14043-14048.
18. Bergsbaken T., Cookson B. T. Macrophage activation redirects *Yersinia*-infected host cell death from apoptosis to caspase-1-dependent pyroptosis. PLoS Pathog. 2007, 3: e161.
19. Bergsbaken T., Cookson B. T. Innate immune response during *Yersinia* infection: critical modulation of cell death mechanisms through phagocyte activation. J. Leukoc. Biol. 2009, 86 (5): 1153-1158.
20. Blank C., Luz A., Bending S. et al. Superantigen and endotoxin synergize in the induction of lethal shock. Eur. J. Immunol. 1997, 27: 825-833.
21. Brodsky I.E., R. Medzhitov R. Reduced secretion of YopJ by *Yersinia* limits in vivo cell death but enhances bacterial virulence. PLoS Pathog. 2008, 4: e1000067.
22. Brodsky I.E., Palm N.W., Sadanand S. et al. *Yersinia* effector protein promotes virulence by preventing inflammasome recognition of the type III secretion system. Cell. Host. Microbe. 2010, 7 (5): 376-387.
23. Cornelis G. The type III secretion injectisome, a complex nanomachine for intracellular 'toxin' delivery. Biol. Chem. 2010, 391 (7): 745-751.
24. Dube P. Interaction of *Yersinia* with the gut: mechanisms of pathogenesis and immune evasion. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2009, 337: 61-91.
25. Eppinger M., Rosovitz M.J., Fricke W.F. et al. The complete genome sequence of *Yersinia pseudotuberculosis* IP31758, the causative agent of Far East scarlet-like fever. PLoS Genet. 2007, 3: e142.
26. Fernandes-Alnemri T., Wu J., Yu J.W. et al. The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. Cell Death Differ. 2007, 14: 1590-1604.
27. Fink S.L., Cookson B.T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. Infect. Immun. 2005, 73: 1907-1916.
28. Fukushima H., Matsuda Y., Seki R. Geographical heterogeneity between Far East and Western countries in prevalence of the virulence plasmid, the superantigen *Yersinia pseudotuberculosis* derived mitogen and the high-pathogenicity island among *Yersinia pseudotuberculosis* strains. J. Clin. Microbiol. 2001, 39: 3541-3547.

29. Jardetzky T.S., Brown J.H., Gorda J.C. et al. Three-dimensional structure of human class II histocompatibility molecule complexed with superantigen. *Nature*. 1994, 368: 711-718.
30. Labbe K., McIntire C.R., Doiron K. et al. Cellular inhibitors of apoptosis proteins cIAP2 are required for efficient caspase-1 activation by the inflammasome. *Immunity*. 2011, 35 (6): 897-907.
31. Lilo S., Zheng Y., Bliska J.B. Caspase-1 activation in macrophages infected with *Yersinia pestis* KIM requires the type III secretion system effector YopJ. *Infect. Immun.* 2008, 76: 3911-3923.
32. Marketon M.M., DePaolo R.W., DeBord R.W. et al. Plaque bacteria target immune cells during infection. *Science*. 2005, 309: 1739-1741.
33. Medzhitov R., Schneider D.S., Soares M.P. Disease tolerance as a defense strategy. *Science*. 2012, 335 (6071): 936-941.
34. Meinzer U., Barreau F., Esmiol-Welterlin S. et al. *Yersinia pseudotuberculosis* effector YopJ subverts the Nod2 rick Tak1 pathway and activates caspase-1 to induce intestinal barrier dysfunction. *Cell. Host. Microbe*. 2012, 11 (4): 337-351.
35. Miyoshi-Akiyama T., Fujimaki W., Yan X.J. et al. Identification of murine T cells reactive with the bacterial superantigen *Y. pseudotuberculosis* — derived mitogen (YPM) and factors involved in YPM-induced toxicity in mice. *Microbiol. Immunol.* 1997, 41: 345-352.
36. Moreau K., Lacas-Gervis S., Fujita N. et al. Autophagosomes can support *Yersinia pseudotuberculosis* replication in macrophages. *Cell. Microbiol.* 2010, 12 (8): 108-123.
37. Norenberg D., Wieser A., Magistro G. et al. Molecular analysis of a novel Toll/interleukin-1 receptor (TIR)-domain containing virulence protein of *Y. pseudotuberculosis* among Far East scarlet-like fever serotype I strains. *Intern. J. Med. Microbiol.* 2013, 303: 583-594.
38. O'Loughlin J.L., Spinner J.L., Minnich S.A., Kobayashi S.D. *Yersinia pestis* two-component gene regulatory systems promote survival in human neutrophils. *Infect. Immun.* 2010, 78 (2): 773-782.
39. Peters K.N., Dhariwala M.O., Hughes-Hanks J.M. Early apoptosis of macrophages modulated by injection of *Yersinia pestis* YopK promotes progression of primary pneumonic plague. *PLoS Pathog.* 2013, 9 (4): e1003324.
40. Sanmun D., Witasp E., Jitkaew S. et al. Involvement of a functional NADPH oxidase in neutrophils and macrophages during programmed cell clearance: implications for chronic granulomatous disease. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2009, 3: 621-631.
41. Sato K., Ouchi K., Taki M. et al. *Yersinia pseudotuberculosis* infection in children, resembling Izumi fever and Kawasaki syndrome. *Pediatr. Infect. Dis.* 1983, 2: 123-126.
42. Savina C., Martina L., Bouchierb Ch. et al. The *Yersinia pseudotuberculosis* complex: Characterization and delineation of a new species, *Yersinia wautersii*. *Intern. J. Med. Microbiol.* 2014, 304: 452-463.
43. Shao F. Biochemical functions of *Yersinia* type III effectors. *Curr. Opin. Microbiol.* 2008, 11: 21-29.
44. Silva M.T. When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system. *J. Leukoc. Biol.* 2010, 87 (1): 93-106.
45. Spinner J.L., Cundiff J.A., Kobayashi S.D. *Yersinia pestis* type III secretion system-dependent inhibition of human polymorphonuclear leukocyte function. *Infect. Immun.* 2008, 76: 3754-3760.
46. 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, 18: e9279.
47. Tseneva G.Y., Chesnokova M.V., Klimov V.T. et al. Pseudotuberculosis in the Russian Federation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012, 954: 63-68.
48. Tsubokura M., Orsuki K., Sato K. et al. Special features of distribution of *Yersinia pseudotuberculosis* in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 1989, 27: 790-791.
49. Zauberman A., Cohen S., Mamroud E. et al. Interaction of *Yersinia pestis* with macrophages: limitations in YopJ-dependent apoptosis. *Infect. Immun.* 2006, 74: 3239-3250.
50. Zippelius A., Pittet M.J., Batard P. et al. Thymus selection generates a large T cell pool recognizing a self-peptide in humans. *J. Exp. Med.* 2002, 195: 485-494.

51. Zhang Y., Murtha J., Roberts M.A. et al. Type III secretion decreases bacterial and host survival following phagocytosis of *Yersinia pseudotuberculosis* by macrophages. *Infect. Immun.* 2008, 76 (9): 4299-4310.
52. Zheng Y., Lilo S., Mena P., Bliska J.B. YopJ-induced caspase-1 activation in *Yersinia*-infected macrophages: independent of apoptosis, linked to necrosis, dispensable for innate host defense. *PLoS One.* 2012, 7: e36019.
53. Viboud G.I., Bliska J.B. *Yersinia* outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* 2005, 59: 69-89.

Поступила 10.05.16

Контактная информация: Сомова Лариса Михайловна, д.м.н., проф.,
690087, Владивосток, ул. Сельская, 1, р.т. (8-423)244-14-48

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

В.И.Ефременко¹, А.А.Ефременко², Д.В. Ефременко¹

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СОЗДАНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЭТИОТРОПНОЙ ТЕРАПИИ И ПРОФИЛАКТИКИ ЛИХОРАДКИ ЗАПАДНОГО НИЛА И КРЫМСКОЙ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ

¹Ставропольский противочумный институт, ²Ставропольский государственный медицинский университет

Рассматриваются проблемные вопросы создания и практического внедрения специфических иммунобиологических препаратов, отсутствующих до настоящего времени, для лечения и профилактики природно-очаговых арбовирусных инфекций — лихорадки Западного Нила (ЛЗН) и Крымской геморрагической лихорадки (КГЛ). На территориях Южного и Северо-Кавказского федеральных округов России сформировались стойкие природные очаги ЛЗН и КГЛ с эпидемическими проявлениями. В центральных регионах России и в Сибири обнаруживаются маркеры вируса Западного Нила, а среди здорового населения также определяется наличие иммунной прослойки к этой инфекции. Проведенный анализ литературных источников формирует теоретическую основу для создания новых специфических препаратов для этиотропной терапии и профилактики ЛЗН и КГЛ. В качестве сырья возможно использование крови здоровых доноров с достаточно высокими титрами иммуноглобулинов класса G, проживающих в некоторых субъектах Российской Федерации на территории природных очагов с наиболее интенсивным эпидемическим процессом.

Журн. микробиол., 2016, № 6, С. 85—93

Ключевые слова: лихорадка Западного Нила, Крымская геморрагическая лихорадка, лечение, профилактика, иммунобиологические препараты

V.I.Efremenko¹, A.A.Efremenko², D.V.Efremenko¹

THEORETICAL ASPECTS OF CREATION OF SPECIFIC PREPARATIONS FOR ETIOTROPIC THERAPY AND PROPHYLAXIS OF WEST NILE FEVER AND CRIMEAN HAEMORRHAGIC FEVER

¹Stavropol Institute for Plague Control, ²Stavropol State Medical University, Russia

Problematic issues on creation and practical introduction of specific immune biologic preparations for therapy and prophylaxis of natural-foci arbovirus infections — West Nile fever (WNF) and Crimean hemorrhagic fever (CHF), that are not available until now, are examined. Persistent natural foci of WNF and CHF with epidemic manifestations have formed in Southern and North Caucasian Federal Districts of Russia. Markers of West Nile virus are being detected in central regions of Russia and Siberia, and the presence of fraction of population immune to this infection