

ПСЕВДОТУБЕРКУЛЕЗ: ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ КЛЕТОК ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА

¹НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П.Сомова, ²Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток

В обзоре обобщены новые данные о механизмах врожденной иммунной защиты при инфекциях, вызываемых патогенными *Yersinia*, что в значительной степени было обусловлено комплексными разработками относительно уникальной пары генетически родственных возбудителей *Y. pseudotuberculosis/Y. pestis*. Проведенные нами ранее исследования выявили морфологический субстрат относительного гранулоцитарного иммунодефицита, обуславливающего характерные патоморфологические особенности псевдотуберкулеза. К настоящему времени получены доказательства того, что патогенные для человека виды *Yersinia* преимущественно инактивируют защитную функцию клеток врожденного иммунитета, что является важной стратегией, с помощью которой эти бактерии избегают элиминации и вызывают заболевание. В ответ на заражение патогенными *Yersinia* фундаментальную роль в первичной иммунной защите и в ограничении первоначального распространения бактерий в организме играют нейтрофилы (ПЯЛ), которые используют несколько механизмов для ликвидации бактерий, таких как фагоцитоз, оксидативный стресс, секреторная дегрануляция, образование нейтрофильных внеклеточных ловушек, эффероцитоз. Инфицированные ПЯЛ могут действовать как промежуточный хозяин для последующей невоспалительной инфекции макрофагов. Дальнейшее раскрытие вопросов, касающихся первичной антиинфекционной защиты при *Yersinia* инфекциях даст ключ к пониманию иммунопатогенеза эпидемического псевдотуберкулеза (дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки) и в целом иерсиниозов.

Журн. микробиол., 2017, № 5, С. 78—90

Ключевые слова: псевдотуберкулез, нерсиниозы, патогенез, клетки врожденного иммунитета, нейтрофилы (ПЯЛ), макрофаги

L.M.Somova¹, N.G.Plekhova^{1,2}, E.I.Drobot¹, I.N.Lyapun¹

PSEUDOTUBERCULOSIS: PATHOGENETIC VALUE OF INNATE IMMUNITY CELLS

Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, ²Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia

Novel data on mechanisms of innate immunity during infections with pathogenic *Yersinia* are summarized in the review, that was mostly determined by complex developments regarding a unique pair of genetically related causative agents *Y. pseudotuberculosis/Y. pestis*. Our previous studies have revealed a morphological substrate of relative granulocyte immune deficiency that determines characteristic pathomorphologic features of pseudotuberculosis. To date, evidence has been obtained, that pathogenic for human *Yersinia* predominately activate protective function of innate immunity cells that is an important strategy to avoid elimination and cause the disease for the bacteria. Neutrophils (PMNs) play a fundamental role in response to infection by pathogenic *Yersinia* in primary immune response and limit of primary spread of bacteria that use several mechanisms of eradication of bacteria, e.g.: phagocytosis, oxidative stress, secretory degranulation, formation of neutrophil extracellular traps, efferocytosis. Infected PMNs can act as an intermediate host for consequent non-inflammatory infection of macrophages. Further elaboration of questions relating to primary anti-infection protection during *Yersinia* infections gives a key to understanding of immune pathogenesis of epidemic pseudotuberculosis (far Eastern scarlet-like fever) and yersiniosis in general.

Key words: pseudotuberculosis, yersiniosis, pathogenesis, innate immunity cells, PMNs, macrophages

Псевдотуберкулез у человека до середины 1950-х годов встречался как редкое спорадическое заболевание, протекающее в виде острого аппендицита и мезентериального лимфаденита, и был известен лишь в Европейских странах, Северной и Южной Америке, Японии, Индии [37]. Решающую роль в изучении эпидемического псевдотуберкулеза сыграло открытие в 1959 году на Дальнем Востоке России нового клинко-эпидемического проявления этой болезни у человека — дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки (ДСЛ) [13].

Особое положение возбудителя болезни, *Yersinia pseudotuberculosis*, как прародителя особо опасной чумной инфекции, *Yersinia pestis* [18], подчеркивает важность исследований по антиинфекционной защите организма. В процессе эволюции *Y. pseudotuberculosis* в *Y. pestis* [18] у последней развились как крайняя вирулентность, так и трансмиссивный способ передачи, уникальный среди семейства *Enterobacteriaceae*. Эти два вида являются генетически почти идентичными [22], но крайне различающимися по степени патогенности. Переход *Y. pseudotuberculosis* в *Y. pestis* сопровождался утратой многих и приобретением нескольких генов, ассоциированных с патогенностью, при этом не следует забывать, что у *Y. pseudotuberculosis* сохранилась способность вызывать у человека геморрагическую пневмонию, напоминающую легочную чуму. В настоящее время *Y. pseudotuberculosis*/*Y. pestis* рассматриваются как уникальная пара, которая предоставляет возможность для углубленного изучения и сравнительного анализа патофизиологических процессов, связанных с высокой степенью патогенности.

Псевдотуберкулез по механизму патогенеза относится к общим инфекциям, протекающим с гематогенной и лимфогенной диссеминацией возбудителя и резко выраженным токсико-аллергическим синдромом. К началу 1990-х годов была сформулирована [4] экспериментально обоснованная концепция патоморфогенеза псевдотуберкулеза, впервые показан морфологический субстрат относительного вторичного иммунодефицита, обуславливающего характерные патоморфологические особенности псевдотуберкулеза с образованием гранулем с центральным кариорексисом, последовательной сменой в очаге воспаления реакций гиперчувствительности немедленного и замедленного типов.

Одним из кардинальных проявлений псевдотуберкулеза является патология лимфатического аппарата с наиболее выраженным изменением брыжеечных лимфатических узлов (до 62,4% случаев), что обусловлено алиментарным характером инфицирования. При псевдотуберкулезе возможно развитие не только мезентериального лимфаденита, но и лимфаденитов другой локализации, а также полиаденитов. Не вызывает сомнения, что поражение лимфатического аппарата при псевдотуберкулезе, охарактеризованное первоначально как «абсцедирующий ретикулоцитарный лимфаденит», следует рассматривать с точки зрения иммунологической функции лимфоидной ткани. Септицемия может возникнуть почти при всех формах псевдотуберкулеза [1], и потенциальные возможности развития иерсиниозного сепсиса заложены в основе характера инфекционного процесса и иммунологического ответа организма на специфические антигены. В патоморфологиче-

ской картине псевдотуберкулезного сепсиса у человека, как и у животных, преобладают многочисленные абсцессоподобные и некротические узелки в органах, особенно в печени и селезенке, которые являются морфологическим подтверждением иммунологической недостаточности организма [4]. Реакции иммунной системы при псевдотуберкулезе протекают согласно закономерностям, имеющим общие черты с таковыми при чуме, туляремии, бруцеллезе [12]. Склонность заболевания к обострениям и рецидивирующему течению имеет причинно-следственную связь с нарушениями в системе иммуногенеза [1, 4, 13].

В лимфатическом аппарате как у человека, так и у экспериментальных животных наблюдается сочетание иммуноморфологических реакций и воспалительно-деструктивных изменений [4], характеризующих у 21% перорально зараженных животных состояние иммунодефицита в период с 3 до 21 сут инфекции. При тяжелом течении псевдотуберкулеза с наличием многочисленных некротических очагов и обсеменением бактериями различных органов у 11,2% животных выявлялось резкое разрежение ткани лимфатических узлов и лимфоидных фолликулов слизистой кишечника в виде «сетчатого метаморфоза» и макрофагальная реакция в них. По мнению А.П.Авцына и др. [1], этот признак подтверждает иммунологическую недостаточность. При заражении вирулентным штаммом *Y. pseudotuberculosis* морфологические признаки иммунодефицита у 18,6% животных обнаруживались также в селезенке, что выражалось в отсутствии реактивных изменений в В-зависимых зонах лимфатических фолликулов на фоне некротических очагов и обсеменения органа бактериями, а также в очаговом разрежении и частичной делимфатизации пульпы с оголением ретикулярной стромы.

Действие эндотоксина грамотрицательных бактерий на мембраны нейтрофилов может извращать их метаболизм в направлении снижения оксидазных и бактерицидных свойств. С цитотоксическим действием *Y. pseudotuberculosis* и интралейкоцитарных высокореактивных метаболитов в значительной мере может быть связана массовая гибель лейкоцитов, продукты распада которых, в свою очередь, воздействуют на внеклеточно расположенные бактерии и вызывают повреждение их. Липополисахарид *Y. pseudotuberculosis* оказывает цитотоксическое влияние на лейкоциты и имеет патогенетическое значение в развитии иммунодефицита при псевдотуберкулезе [6]. Доказана также роль комплекса белков семейства токсинов *Y. pestis* в резистентности к фагоцитозу полиморфноядерными лейкоцитами [Spinner J.L. et al., 2013].

Н.Ф.Тимченко и др. [16] сформулировано представление о спектре токсинов, продуцируемых *Y. pseudotuberculosis*, имеющих важное значение в патогенности вида и опосредовании полиморфизма клинических проявлений эпидемического псевдотуберкулеза (ДСЛ). Одним из этих токсинов является термостабильный летальный токсин (ТсТ), иммуногенный белок молекулярной массой 45 кДа, который продуцируют 82,6% дальневосточных штаммов *Y. pseudotuberculosis*. Этот токсин вызывает у животных полиорганные поражения с образованием типичных для псевдотуберкулеза гранулем с центральным карioreксисом, а также оказывает иммунодепрессивное действие на разные звенья иммунитета. Оно выражается в снижении фагоцитарной активности нейтрофилов и макрофагов по отношению как к гомо-, так и к гетерологичным микроорганизмам, влиянии на окислительную и антиокислительную систему иммунокомпетентных клеток, подавлении гуморального ответа

мышей к тимус-зависимому антигену (эритроцитам барана), а также в ингибировании интенсивности реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) и воздействии на антителообразование.

Таким образом, результаты исследований, полученные к началу 2000-х годов, свидетельствовали о том, что при псевдотуберкулезе эффективная противoinфекционная защита зависит от нормального функционирования единой иммунофагоцитарной системы и определяется чувствительностью организма к различным по вирулентности популяциям возбудителя, массивностью инфекта и повторностью инфицирования, степенью сенсибилизации и иммунологической реактивностью организма [4, 13].

Псевдотуберкулез сопровождается значительными иммунными сдвигами в организме, направленность которых коррелирует с тяжестью течения инфекции. Депрессивное действие вирулентных штаммов *Y. pseudotuberculosis* на иммунную систему экспериментальных животных подтвердили М. Simonet и Р. Berche (1986). Явления иммуносупрессии у больных обычно имели место при тяжелых и рецидивирующих формах инфекции [12], при этом наблюдался дефект как гуморального, так и клеточного звена иммунитета. В организме человека иммунная недостаточность по отношению к возбудителю псевдотуберкулеза в большинстве случаев носит временный характер и не ведет к фатальному исходу.

Факторами, определяющими специфику патологических изменений при псевдотуберкулезе, являются биологические особенности возбудителя, главным образом его устойчивость к фагоцитозу. Способность *Y. pseudotuberculosis* размножаться в фагоцитах, в частности в макрофагах, является одним из факторов вирулентности этих бактерий [17]. Возбудитель псевдотуберкулеза обладает комплексом факторов патогенности, способных подавлять естественную резистентность организма, в том числе высоким потенциалом клеточной и тканевой инвазивности, скоростью реализации которой, по-видимому, играет решающую роль при взаимодействии паразита и хозяина. Именно антифагоцитарная устойчивость обеспечивает «диким» типам *Yersinia* высокую вирулентность при введении внутривенным путем, который допускает немедленное взаимодействие их с фиксированными макрофагами. Устойчивостью к фагоцитозу обладают иерсинии, содержащие плазмиду вирулентности *pYV* с мол. массой 45 МД, что обеспечивается синтезом белков *Yop 1* и *Yop 2* наружной мембраны бактерий [46].

Традиционно считалось, что полиморфноядерные лейкоциты (ПЯЛ, нейтрофилы), имеющие бактерицидные системы, первоначально оказывают обезвреживающий эффект, воздействуя на иерсинии секреторными продуктами и частично поглощая микроорганизмы, а макрофаги, содержащие набор гидролаз, поглощают и переваривают эти микроорганизмы. Вплоть до 2000-х годов существовало две точки зрения на роль фагоцитов в развитии резистентности к псевдотуберкулезу. Согласно первой [7], первостепенное значение в обезвреживании *Y. pseudotuberculosis* принадлежит продуктам распада ПЯЛ; согласно второй [12], в очищении организма от возбудителя основное значение имеют макрофаги, входящие в систему мононуклеарных фагоцитов.

С начала 2000-х годов активизировались исследования по врожденной иммунной защите при инфекциях, вызываемых патогенными бактериями рода *Yersinia*, большой интерес к которым предопределен их причислением к группе эмерджентных инфекций, возбудители которых стали рассматриваться как потенциальные агенты биотерроризма [14]. Непредсказуемость и опас-

ность их возникновения требуют всестороннего изучения на основе новых технологий. В настоящее время возбудитель псевдотуберкулеза, именно штаммы конкретной клональной линии *Y. pseudotuberculosis*, вызывающие дальневосточную скарлатиноподобную лихорадку (эпидемический псевдотуберкулез), имеющие измененный ген кластера вирулентности, привлекают внимание исследователей всего мира в качестве модели для раскрытия молекулярных механизмов взаимодействия патогенных *Yersinia* в системе микроорганизм-хозяин, где первостепенное значение придается клеткам врожденного иммунитета [40].

Нейтрофилы являются наиболее распространенными лейкоцитами, которые быстро рекрутируются из кровотока и арсеналов костного мозга в очаг инфекции, где они служат в качестве исходной клеточной защиты от вторгающихся патогенов [39]. Инфицировавшие организм патогены фагоцитируются ПЯЛ и высвобождают массив микробицидных агентов, способных уничтожить большинство бактерий и грибов. Получено достаточно доказательств того, что патогенные для человека виды *Yersinia* (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*) преимущественно инактивируют клетки врожденного иммунитета, что является важной стратегией, с помощью которой эти бактерии избегают элиминации и вызывают заболевание [11, 50]. В ответ на заражение иерсиниями фундаментальную роль в первичной иммунной защите играют нейтрофилы, которые используют несколько механизмов для ликвидации бактерий, таких как фагоцитоз, оксидативный стресс, секреторная дегрануляция, образование нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET), эффероцитоз [2, 29, 35]. Иерсинии, в определенной мере ингибируя фагоцитоз и оксидативный стресс в фагоцитах животных и человека, индуцируют высвобождение провоспалительных цитокинов и развитие апоптоза фагоцитирующих клеток [12].

В клетках очага воспаления у животных, инфицированных внутрибрюшинно *Y. pseudotuberculosis*, обнаружено увеличение активности эктоферментов плазмалеммы (АТФ-азы, 5'-нуклеотидазы, лактатдегидрогеназы), что ассоциировалось с изменениями клеточного гликолиза [11]. Усиление анаэробного окисления требуется как механизм адаптационного ответа клеток на воздействие патогенов. Обнаруженное авторами усиление активности ферментов кислородзависимой бактерицидной системы (СДГ, МПО) и внутриклеточной продукции NO связано с клеточной гибелью по типу некроза на 3 день после заражения *Y. pseudotuberculosis*. Повторный рост уровня нитритов в клетках предшествовал появлению апоптотических клеток, которые обнаружены на 5 и 10 дни инфицирования. Исследования на модели *in vitro* показали апоптоз-индуцирующее действие *Y. pseudotuberculosis* на клетки врожденного иммунитета, в большей степени на нейтрофилы, чем макрофаги. Максимальное количество апоптотических нейтрофилов наблюдалось на 7 день после заражения ($45 \pm 3,3\%$). Апоптоз макрофагов обнаружен на 2 день после экспозиции с бактериями ($29 \pm 3\%$). Кроме некроза и апоптоза нейтрофилов при воздействии *Y. pseudotuberculosis* авторами обнаружен 3 тип клеточной гибели – образование внеклеточных ловушек. Эти результаты повышенной метаболической активности нейтрофилов и макрофагов, инфицированных *Y. pseudotuberculosis*, подтвердили важную роль этих клеток в патогенезе данной инфекции.

В опытах *in vivo* при внутрибрюшинном заражении беспородных мышей нами получены данные о вариабельности метаболической активности клеток

очага воспаления (перитонеальный экссудат) при инфицировании разными плазмидными типами *Y. pseudotuberculosis*. В ответ на заражение более вирулентным типом *Y. pseudotuberculosis*, содержащим две плазмиды pYV и pVM 82, преимущественное значение в обеспечении бактерицидного потенциала фагоцитов имела продукция метаболитов оксида азота, а не активных форм кислорода, по сравнению с менее вирулентным плазмидным типом, содержащим единственную плазмиду pVM 82. Вероятно, это свидетельствует о дополнительном биологическом эффекте, ассоциированном с плазмидой pVM 82, содержащейся только в дальневосточных штаммах возбудителя эпидемического псевдотуберкулеза (ДСЛ), в защитной иммунной реакции организма.

Фагоцитоз бактерий может инициировать апоптоз ПЯЛ [27], что приводит к представлению фосфатидилсерина (PS) на плазматической мембране этих клеток [21]. PS распознается макрофагами, дендритными и другими компетентными клетками (включая эндотелиальные клетки, гладкие мышечные клетки и фибробласты), что приводит к поглощению и клиренсу апоптотических ПЯЛ, называемому эффероцитозом [43, 49]. Эффероцитоз апоптотических ПЯЛ уменьшает повреждение окружающей ткани, предотвращая высвобождение ПЯЛ-микробицидных агентов, увеличивает выработку противовоспалительных молекул и подавляет воспалительные молекулы [43]. Инфекция макрофагов путем эффероцитоза считается «немым» путем для патогенных микроорганизмов, чтобы войти в клетку-мишень хозяина, и, таким образом, была названа моделью «троянского коня» [24], поскольку поглощение апоптотических ПЯЛ ингибирует активацию антимикробных эффекторных функций фагоцитов [30, 43]. Важно отметить, что бактерии рода *Yersinia*, в том числе, *Y. pestis*, фагоцитированные нейтрофилами, в основном обезвреживаются, в то время как бактерии, поглощенные макрофагами, выживают и реплицируются, и что болезнь прогрессирует от бактерий, которые остаются внеклеточными или которые поглощены макрофагами [42].

Инфицированные ПЯЛ могут действовать как промежуточный хозяин для последующей невоспалительной инфекции макрофагов [49]. Авторами показано, что в нейтрофилах поглощенная *Y. pestis* содержится и реплицируется в фагосомах и что репликация в фагосомах не зависит от плазмиды вирулентности pCD1 (аналог плазмиды pYV у *Y. pseudotuberculosis*). Сходные проценты ПЯЛ у животных, инфицированных pCD1⁺ или pCD1⁻ штаммами *Y. pestis*, представляли фосфатидилсерин (PS) на их поверхности в течение 4 — 12 ч инфицирования, распознавались и поглощались макрофагами. Исследования с использованием *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, выращенными при 37°C, показали увеличение числа PS⁺ ПЯЛ человека с течением времени после заражения [31], а мышинные ПЯЛ, выделенные после 1 — 2 дня инфицирования, содержали жизнеспособные *Y. pestis* и были почти все PS⁺ [34].

При укусе инфицированной блохи *Y. pestis* попадает в дерму и приводит к рекрутированию нейтрофилов и макрофагов в очаг воспаления. Доказано выживание и репликация *Y. pestis* в фагосомах нейтрофилов человека с дальнейшим поглощением инфицированных нейтрофилов макрофагами [49]. *Y. pestis* может нарушить нейтрофильный ответ и выжить в месте входных ворот инфекции, диссеминировать и персистировать в организме хозяина. Несмотря на то, что геном *Yersinia* кодирует набор антифагоцитарных факторов вирулентности, был отмечен фагоцитоз *Y. pestis* в помощьью нейтрофилов и макрофагов. J.L. Spinner et al. [49] проанализировали гипотезу, что *Y. pestis*, выра-

щенные при температуре окружающей среды блох-вектора (21°C), могут выживать и реплицироваться внутри нейтрофилов и далее утилизироваться этими клетками в качестве пути, по которому затем происходит заражение макрофагов. В течение 12 часов инфекции у 70% инфицированных *Y. pestis* нейтрофилов присутствовал фосфатидилсерин (PS) на их поверхности. PS⁺ нейтрофилы, содержащие *Y. pestis*, *in vitro* персистировали на протяжении 24 часов инфекции. Поглощение PS⁺ нейтрофилов подавляет активацию анти-микробных эффекторных функций макрофагов, что может способствовать выживанию бактерий чумы в этих клетках. Таким образом, *Y. pestis* может выживать и реплицироваться в пределах ПЯЛ, а зараженные ПЯЛ могут быть маршрутом для невоспалительной инфекции макрофагов.

Учитывая данные о микробицидном значении ядерных гистонов, образующихся при распаде гранулоцитов, на внеклеточные *Y. pseudotuberculosis* [7], можно высказать предположение о том, что при псевдотуберкулезе образование ядерных гистонов имеет отношение к апоптозу ПЯЛ и является одним из проявлений эффероцитоза при взаимодействии возбудителя с клетками врожденного иммунитета. В этой связи, вполне обосновано, что распад клеток с образованием детрита, содержащего ядерные гистоны ПЯЛ, происходит преимущественно вследствие апоптоза, а не некроза клеток, что обуславливает развитие в органах гранулем с так называемым «центральным кариорексисом», типичных для псевдотуберкулеза [1, 15].

Особенности функционального состояния нейтрофилов при псевдотуберкулезе, характеризующиеся несоответствием напряженности иитралейкоцитарных бактерицидных систем и низкой переваривающей способности этих клеток [10], по В.Н.Галанкину и др. [3] означают относительный гранулоцитарный иммунодефицит. При этом нарушается нормальное функционирование ПЯЛ, следствием чего является микробизм и формирование в ткани органов абсцессоподобных очагов. В итоге, при псевдотуберкулезе в очагах воспаления формируется особый нефагоцитарный тип местной резистентности, при котором эффективное бактерицидное действие на возбудителя оказывает фракция ядерного гистона НЗ распадающихся лейкоцитов [7].

Анализ собственных и литературных данных позволил сделать заключение о нарушениях во всех звеньях иммуофагоцитарной системы при псевдотуберкулезе с развитием в части случаев вторичного иммунодефицита, в основе которого лежат специфическое повреждение лимфоидной ткани и дефектность функционирования клеток врожденного иммунитета за счет эффектов плазмид-ассоциированного фактора патогенности *Y. pseudotuberculosis*, связанного, скорее всего, с их цитотоксичностью, угнетающей защитные механизмы хозяина [Wilson M.E., 1985]. С развитием относительного иммунодефицита тесно связана склонность болезни к обострениям и рецидивам, являющимся одним из важных звеньев патогенеза псевдотуберкулеза. Участие ПЯЛ в защите организма должно рассматриваться не только с точки зрения неспецифической резистентности, но и участия их в специфическом иммунном ответе и в реализации иммунопатологических механизмов [9].

Патогенные виды *Yersinia* ориентированы главным образом на ПЯЛ, а также на дендритные клетки и макрофаги путем передачи наружных белков *Yersinia* (*Yops*) через систему секреции III типа (Т3SS) [19, 23, 28]. При проникновении в ПЯЛ эффекторы *Yop* могут ингибировать фагоцитоз, продукцию

активных форм кислорода и образование внеклеточных нейтрофильных ловушек [25, 45, 47].

Важное значение для раскрытия роли *YopS* белков имеют опыты, проведенные с использованием аттенуированных мутантов *Y. pseudotuberculosis*. Антифагоцитоз, скорее всего, является эссенциальным механизмом вирулентности *Yersinia*, и экспериментальные исследования последних лет на мышах подтвердили эту гипотезу, поскольку *yopH* и *yopE* одиночные мутанты элиминируются на ранних стадиях инфицирования [32, 45], причем клиренс *yopH* мутанта обычно происходит на уровне пейеровых бляшек в кишечнике, и *yopE* мутанта в мезентериальные лимфатических узлах. Показано [50], что бактерии *Y. pseudotuberculosis* «дикого типа» на 1 день после заражения взаимодействовали главным образом с дендритными клетками, но не с ПЯЛ, в то время как авирулентные *yopH* и *yopE* мутанты взаимодействовали с ПЯЛ, а также с дендритными клетками.

Для уточнения значимости ПЯЛ на ранних стадиях инфекции, исследователи [50] истощили мышинные ПЯЛ с помощью анти-*LybG* антител, после чего можно было увидеть более эффективную первоначальную колонизацию штамма «дикого типа», а также *yopH*, *yopE* и *yopK* мутантов на 1 день после орального инфицирования. Диссеминация *yopH*, *yopE* и *yopK* мутантов в кишечные отделы и в мезентериальные лимфатические узлы была быстрее у ПЯЛ-истощенных мышей, чем у неистощенных, что подчеркивало важность эффективного нацеливания ПЯЛ посредством внешних белков *Y. pseudotuberculosis* (*YopS*). В итоге, избежание *YopH*, *YopE* и *YopK* мутантов от взаимодействия с ПЯЛ является ключевой особенностью патогенных видов *Yersinia*, что способствует их колонизации и эффективному распространению в инфицированном организме, приводящему к развитию генерализованной инфекции.

При *Y. pseudotuberculosis* инфекции у неистощенных мышей зрелые ПЯЛ были в основном представлены рекрутированными из крови воспалительными клетками [50]. Для дальнейшего исследования увеличения доли макрофагов в инфицированных тканях, пейеровы бляшки и лимфоидные фолликулы слепой кишки от неинфицированных и инфицированных «диким типом» иерсиний мышей, собранные на 3 день после заражения, были окрашены для детекции воспалительных макрофагов путем двойной иммуофлюоресценции с анти-*LybC* и анти-*F4/80*. Полученные данные свидетельствовали о том, что в отсутствие зрелых ПЯЛ увеличивается доля моноцитов в крови, что также приводит к повышению уровня воспалительных макрофагов в инфицированных тканях. Следовательно, в отсутствие зрелых ПЯЛ ($Gr-1^{high} F4/80^{-}$) незрелые ПЯЛ ($Gr-1^{low} F4/80^{-}$) компенсируют их потерю за счет увеличения в крови и также рекрутирования в инфицированные ткани при инфекции. Эти исследования показали значение резистентности *Y. pseudotuberculosis* к ПЯЛ, а также то, что различные *Yop* эффекторы могут внести совместный вклад в экстенсивную способность этого патогена обойти эти бактериальные элиминаторы.

Таким образом, ПЯЛ, которые накапливаются в инфицированных тканях при заражении, играют важную роль в защите от кишечной *Yersinia* [23, 33, 36]. Эти клетки врожденного иммунитета играют фундаментальную роль в ограничении первоначального распространения бактерий в кишечной ткани, и *Y. pseudotuberculosis* демонстрирует способность надежного избегания противомикробного действия этих в норме очень эффективных иммунных

клеток. Показано, что инфекция у ПЯЛ-истощенных мышей, вызванная «диким типом» *Y. pseudotuberculosis*, была лишь легкой при отсутствии ПЯЛ, в то время как уорН, уорЕ и уорК мутанты с аттенуированной вирулентностью имели явно более высокий инфекционный потенциал при отсутствии ПЯЛ [Thorslund S.E. et al., 2013]. Примечательно, что уорН мутант был найден в мезентериальных лимфатических узлах у ПЯЛ-истощенных мышей, даже если этот мутант, как известно, ограничивается пейеровыми бляшками и не способен достичь более глубоких, внекишечных органов [33]. Авторы обнаружили, что более быстрая диссеминация в мезентериальные лимфатические узлы также отражалась в симптомах болезни ПЯЛ-истощенных мышей, инфицированных уорЕ или уорК мутантами, которые показали признаки болезни раньше, чем у неистощенных мышей.

В совокупности, данные литературы предполагают, что все эти Yop эффекторы вместе вносят вклад в ПЯЛ-резистентный фенотип видов *Yersinia* и важны для эффективного выхода бактерий «дикого типа» из ПЯЛ. Поскольку патогенные виды *Yersinia* инактивируют защитную функцию клеток врожденного иммунитета, предполагается наличие эффективного пути для этих бактерий, чтобы избежать элиминацию и вызвать болезнь. Показано, что в течение начальных стадий оральной инфекции у мышей авирулентные уорН и уорЕ мутанты *Y. pseudotuberculosis* по-разному взаимодействуют с клетками врожденного иммунитета по сравнению с бактериями «дикого типа» [50]. В то время, как бактерии «дикого типа» главным образом взаимодействуют с дендритными клетками в тонком кишечнике, мутанты также взаимосвязаны с нейтрофилами. Истощение нейтрофилов с помощью лечения с анти-Ly6G увеличивало вирулентность «дикого типа» уорН и уорЕ мутантов. Авторы сделали заключение, что нейтрофилы играют важную роль в иммунной защите против *Y. pseudotuberculosis* и несут ответственность за ограничение способности уорН и уорЕ мутантов вызывать системное заболевание. Аттенуированные мутанты могут диссеминировать за пределы кишечника и достичь мезентериальных лимфоузлов в отсутствие ПЯЛ, что подтверждает патогенетическое значение этих иммунных клеток в ограничении бактериальной диссеминации и генерализации псевдотуберкулезной инфекции.

У *Yersinia* развились сложные стратегии избегания фагоцитоза, включая апоптоз, расстройство передачи внутриклеточного сигнала и нейтрализацию провоспалительных ответов у хозяина путем использования арсенала секретруемых Yops белков. Кроме манипулирования ответом хозяина с Yop белками, *Yersinia*, как известно, используют несколько других параллельных механизмов, в частности сильный липополисахаридный ответ, чтобы ослабить иммунный ответ хозяина и вызвать заболевание [38]. Для индукции раннего противовоспалительного ответа *Yersinia* модулируют несколькими путями защиты хозяина. Одним из основных активаторов воспаления является семейство STAT белков (signal transducers and activators of transcription – сигнальные преобразователи и активаторы транскрипции). STAT-1 имеет эссенциальную функцию в защите против вирусных и бактериальных патогенов. Удаление STAT-1 у мышей приводит к быстрой смерти от тяжелых инфекций [44]. STAT-1 и STAT-2 активация с помощью IFN индуцирует транскрипцию 100 IFN-стимулирующих генов (ISGs) [44] и ведет к продукции провоспалительных цитокинов и хемокинов. Интерферон-гамма может также взаимодействовать со STAT-1 в активированных макрофагах, и это ведет к стимуляции индуцибельной нитроксидсинтазы (iNOS) и NADPH оксидазы, которая

способствует киллингу внутриклеточных патогенов [48]. При этих путях интерферон-гамма играет протективную роль во время бактериальных инфекций. Продукция интерферона активируется после фосфорилирования 1 — 2 основных факторов транскрипции (interferon response factor 3 и NFκB). Белок YopJ *Y. pseudotuberculosis* необходим для ингибирования продукции TNF-α и подавления MAP-киназ p38 в макрофагах [41].

В очаге воспаления имеется несколько механизмов кооперации нейтрофилов и макрофагов: гранулоциты взаимодействуют с клеточными опсонинами, помогают поглощению бактерий макрофагами, частично или полностью обезвреживают бактерии, активируют макрофаги и последующий процесс фагоцитоза макрофагами [5, 8]. Высвобождение преформированных биологически активных веществ составляет важнейший этап реализации эффекторного потенциала зрелого нейтрофила, который осуществляется в процессе фаго- и пиноцитоза, а также дегрануляции с выделением этих веществ во внеклеточное пространство. Имеются данные о наличии в очагах воспаления обратной связи между поли- и мононуклеарами. В системе *in vitro* установлено, что супернатанты интактных и активированных бактериями *Y. pseudotuberculosis* нейтрофилов повышают эффективность фагоцитарной функции макрофагов и их пролиферативную активность [10], что является одним из механизмов, лежащих в основе формирования резистивной клеточной резистентности.

Внутренние регуляторные механизмы, контролирующие активность клеток врожденного иммунитета, еще недостаточно определены. Недавно идентифицирована ранее не известная функция IL-17A как внутреннего регулятора координирования антимикробной активности нейтрофилов и макрофагов, чтобы обеспечить защиту против иерсиниозной инфекции [20]. Авторы обнаружили, что таким путем сигнальный фактор IL-17 может обеспечивать защиту против раннего воспаления при легочной чуме, и уровень IL-17 заметно увеличивался при инициации инфекции, тогда как отмена IL-17A значительно усугубляла тяжесть инфекции. Это указывает, что IL-17A и INF-гамма критически вовлекаются в содействие врожденным иммунным клеткам при формировании антиинфекционного иммунитета.

Исследования F. Guinet et al. [26] показали, что инициальные проявления заболевания в течение первых 24 часов протекали аналогично при обеих *Y. pseudotuberculosis*/*Y. pestis* инфекциях, указывая, что экспрессия уникальной патогенности *Y. pestis* откладывается до более поздних стадий инфекционного процесса, когда значительные различия гистологических характеристик были ассоциированы с дренажным (региональным к месту заражения) лимфатическим узлом (ДЛУ). По данным мультикорреспондентского анализа (МСА) авторы определили наиболее дифференциальные тканевые поражения, а именно: *Y. pseudotuberculosis* инфекция сопровождалась организованной реакцией клеток врожденного иммунитета с образованием абсцессоподобных инфильтратов из полиморфноядерных клеток, сдерживающих инфекцию, в то время как *Y. pestis* инфицированный ДЛУ демонстрировал инфильтративный характер инфекции, поврежденную плотность ткани и сосудистые скопления с инвазией ткани свободными бактериями. Таким образом, исключительная вирулентность вида *Y. pestis* связывается не с его приобретенным интрадермальным порталом проникновения в организм хозяина через укусы блохи, а с отчетливой массивной диффузной инфильтрацией ДЛУ без эффективной абсцессоподобной защиты за счет организованной реакции ПЯЛ.

Таким образом, в последние 15 лет получены новые данные о клеточных и молекулярных механизмах врожденной иммунной защиты при инфекциях, вызываемых патогенными *Yersinia*, что в значительной степени было обусловлено комплексными разработками относительно уникальной пары генетически родственных возбудителей *Y. pseudotuberculosis*/*Y. pestis*. Проведенные нами ранее исследования выявили морфологический субстрат относительно гранулоцитарного иммунодефицита, обуславливающего характерные патоморфологические особенности псевдотуберкулеза. К настоящему времени получены доказательства того, что патогенные для человека виды *Yersinia* (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*) преимущественно инактивируют защитную функцию клеток врожденного иммунитета (нейтрофилов, моноцитов/макрофагов), что является важной стратегией, с помощью которой эти бактерии избегают элиминации и вызывают заболевание. Высказано предположение, что Yop эффекторы вносят вклад в ПЯЛ-резистентный фенотип *Yersinia* и важны для эффективного выхода бактерий из этих клеток. В ответ на заражение патогенными *Yersinia* фундаментальную роль в первичной иммунной защите и в ограничении первоначального распространения бактерий в организме играют нейтрофилы (ПЯЛ), которые используют несколько механизмов для ликвидации бактерий, таких как фагоцитоз, оксидативный стресс, секреторная дегрануляция, образование нейтрофильных внеклеточных ловушек, эффероцитоз. Важно отметить, что *Yersinia*, включая *Y. pestis*, поглощенные макрофагами, способны выживать и реплицироваться и что болезнь прогрессирует от бактерий, которые остаются внеклеточными или которые поглощены макрофагами. Инфицированные ПЯЛ могут действовать как промежуточный хозяин для последующей невоспалительной инфекции макрофагов. Дальнейшее раскрытие вопросов, касающихся первичной антиинфекционной защиты при *Yersinia* инфекциях даст ключ к пониманию иммунопатогенеза эпидемического псевдотуберкулеза и в целом иерсиниозов, а также расширит представления о нефагоцитарном типе резорбтивной клеточной резистентности при этих инфекциях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авцын А.П., Исачкова Л.М., Жаворонков А.А. и др. Основные черты патогенеза псевдотуберкулеза. Архив патологии. 1990, 5: 3-7.
2. Андрюков Б.Г., Сомова Л.М., Дробот Е.И., Матосова Е.В. Антимикробная стратегия нейтрофилов при инфекционной патологии. Клиническая лабораторная диагностика. 2016, 61 (12): 825-833.
3. Галанкин В.Н., Токмакова А.М., Боцманов К.В. О структурных основах снижения неспецифической антибактериальной резистентности организма, связанной с функционированием системы нейтрофильных лейкоцитов. Архив патологии. 1989, 3: 49-54.
4. Исачкова Л.М., Жаворонков А.А., Антоненко Ф.Ф. Патология псевдотуберкулеза. Владивосток: Дальнаука, 1994.
5. Крашенникова Е.А. Влияние продуктов, выделяемых нейтрофилами, на функции клеток системы мононуклеарных фагоцитов: Автореф. дис. канд. биол. наук. Л., 1987.
6. Кузнецова Т.А., Ермак И.М., Горшкова Р.П. О некоторых аспектах биологического действия липополисахарида бактерий псевдотуберкулеза. Сборник «Иерсиниозы», Новосибирск. 1983, с. 43-50.
7. Мазинг Ю.А. Гистологическая и цитохимическая характеристика экспериментальной и спонтанной псевдотуберкулезной инфекции: Дис. канд. мед. наук. Л., 1982.
8. Мазинг Ю.А. Морфофункциональные основы антимикробной активности фагоцитов: Автореф. дис. д-ра мед. наук. М., 1995.
9. Пауков В.С., Кауфман О.Я. Структурно-функциональная характеристика лейкоцитов

- и их роль в формировании воспалительных и иммунных процессов. Архив патологии. 1983, 5: 3-13.
10. Плехова Н.Г. Функциональное состояние полиморфноядерных лейкоцитов и их влияние на функции макрофагов при некоторых бактериальных инфекциях: Автореф. дис канд. биол. наук. Владивосток, 1996.
 11. Плехова Н.Г., Сомова Л.М., Дробот Е.И. Метаболизм клеток врожденного иммунитета при бактериальных инфекциях. Биомедицинская химия. 2015, 61 (1): 105-114.
 12. Сомов Г.П., Беседнова Н.Н., Дзадзиева М.Ф., Тимченко Н.Ф. Иммунология псевдотуберкулеза. Новосибирск, Наука, 1985.
 13. Сомов Г.П., Покровский В.И., Беседнова Н.Н., Антоненко Ф.Ф. Псевдотуберкулез. М., Медицина, 2001.
 14. Сомова Л.М., Андриков Б.Г., Плехова Н.Г. Проблема иерсиниозов в современном мире. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2015, 12 (4): 661-667.
 15. Сомова Л.М., Плехова Н.Г., Дробот Е.И. Новые аспекты патологии псевдотуберкулеза. Архив патологии. 2012, 74 (3): 60-64.
 16. Тимченко Н.Ф., Недашковская Е.П., Долматова Л.С., Сомова-Исачкова Л.М. Токсины *Yersinia pseudotuberculosis*. Владивосток, Приморский полиграфкомбинат, 2004.
 17. Ценева Г.Я., Солодовникова Н.Ю., Воскресенская Е.А. Молекулярные аспекты вирулентности иерсиний. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2002, 4 (3): 248-266.
 18. Achtman M., Zurth K., Morelli G. et al. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999, 96: 14043-14048.
 19. Autenrieth S.E., Linzer T.R., Hiller C. et al. Immune evasion by *Yersinia enterocolitica*: differential targeting of dendritic cell subpopulations in vivo. PLoS Pathog. 2010, 6: e1001212.
 20. Bi Y., Zhou J., Yang H. et al. IL-17A produced by neutrophils protects against pneumonic plague through orchestrating IFN-gamma-activated macrophage programming. J. Immunol. 2014, 192 (2): 704-713.
 21. Bratton D.L., Henson P.M. Neutrophil clearance: when the party is over, clean-up begins. Trends Immunol. 2011, 32: 350-357.
 22. Chain P.S., Carnial E., Larimer F.W. et al. Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004, 101: 13826-13831.
 23. Durand E.A., Maldonado-Arocho F.J., Castillo C. et al. The presence of professional phagocytes dictates the number of host cells targeted for Yop translocation during infection. Cell. Microbiol. 2010, 12: 1064-1082.
 24. John B., Hunter C.A. Immunology. Neutrophil soldiers or Trojan horses? Science. 2008, 321: 917-918.
 25. Grosdent N., Maridonneau-Parini I., Sory M.P., Cornelis G.R. Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis. Infect. Immun. 2002, 70: 4165-4176.
 26. Guinet F., Ave P., Jones L. et al. Defective innate cell response and lymph node infiltration specify *Yersinia pestis* infection. PLoS ONE, 2008, 3 (2): e1688.
 27. Kobayashi S.D., Braughton, K.R., Whitney A.R. et al. Bacterial pathogens modulate an apoptosis differentiation program in human neutrophils. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003, 100: 10948-10953.
 28. Köberle M., Klein-Gunther A., Schutz M. et al. *Yersinia enterocolitica* targets cells of the innate and adaptive immune system by injection of Yops in a mouse infection model. PLoS Pathog. 2009, 5: e1000551.
 29. Kolaczowska E., Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. Nat. Rev. Immunol. 2013, 13: 159-175.
 30. Laskay T., van Zandbergen G., Solbach W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. Immunobiology. 2008, 213: 183-191.
 31. Laws T.R., Davey M.S., Green C. et al. *Yersinia pseudotuberculosis* is resistant to killing by human neutrophils. Microbes Infect. 2011, 13: 607-611.

32. Logsdon L.K., Mecsas J. Requirement of the *Yersinia pseudotuberculosis* effectors YopH and YopE in colonization and persistence in intestinal and lymph tissues. *Infect. Immun.* 2003, 71: 4595-4607.
33. Logsdon L.K., Mecsas J. The proinflammatory response induced by wild-type *Yersinia pseudotuberculosis* infection inhibits survival of yop mutants in the gastrointestinal tract and Peyer's patches. *Infect. Immun.* 2006, 74: 1516-1527.
34. Lukaszewski R.A., Kenny D.J., Taylor R. et al. Pathogenesis of *Yersinia pestis* infection in BALB/c mice: effects on host macrophages and neutrophils. *Infect. Immun.* 2005, 73: 7142-7150.
35. Martin C.J., Booty M.G., Rosebrock T.R. et al. Efferocytosis is an innate antibacterial mechanism. *Cell Host Microbe.* 2012, 12: 289-300.
36. McCoy M.W., Marre M.L., Lesser C.F., Mecsas J. The C-terminal tail of *Yersinia pseudotuberculosis* YopM is critical for interacting with RSK1 and for virulence. *Infect. Immun.* 2010, 78: 2584-2598.
37. Mollaret H. Le laboratoire dans le diagnostic d' infection humaine a bacilli de Malasser et Vignal. *Gaset. Med. Paris.* 1965.
38. Montminy S.W., Khan N., McGrath S. et al. Virulence factors of *Yersinia pestis* are overcome by a strong lipopolysaccharide response. *Nat. Immunol.* 2006, 7: 1066-1073.
39. Nauseef W.M. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol. Rev.* 2007, 219: 88-102.
40. Norenberg D., Wieser A., Magiuseppe G. et al. Molecular analysis of a novel Toll/interleukin-1 (TIR)-domain containing virulence protein of *Y. pseudotuberculosis* among Far East scarlet-like fever serotype 1 strains. *Intern. J. Med. Microbiol.* 2013, 303: 583-594.
41. Palmer L.E., Hobbie S., Galan J.E., Bliska J.B. YopJ of *Yersinia pseudotuberculosis* is required for the inhibition of macrophage TNF- α production and downregulation of the MAP kinases p38 and JNK. *Mol. Microbiol.* 1998, 27: 953-965.
42. Pujol C., Bliska J.B. Turning *Yersinia* pathogenesis outside in: subversion of macrophage function by intracellular yersiniae. *Clin. Immunol.* 2005, 114: 216-226.
43. Ravichandran K.S., Lorenz U. Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. *Nat. Rev. Immunol.* 2007, 7: 964-974.
44. Rayamajhi M., Humann J., Kearney S. et al. Antagonistic crosstalk between type I and II interferons and increased host susceptibility to bacterial infections. *Virulence.* 2010, 1: 418-422.
45. Rolán H.G., Durand E.A., Mecsas J. Identifying *Yersinia* YopH targeted signal transduction pathways that impair neutrophil responses during in vivo murine infection. *Cell Host Microbe.* 2013, 14: 306-317.
46. Rosqvist R., Bolin I., Wolf-Watz H. Inhibition of phagocytosis in *Yersinia pseudotuberculosis* a virulence plasmid-encoded ability involving the YOP 2 protein. *Infect. Immunol.* 1988, 8 (56): 2139-2143.
47. Rosqvist R., Forsberg A., Rimpilainen M. et al. The cytotoxic protein YopE of *Yersinia* obstructs the primary host defence. *Mol. Microbiol.* 1990, 4: 657-667.
48. Schroder K., Hertzog P.J., Ravasi T., Hume D.A. (2004). Interferon- gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 2004, 75: 163-189.
49. Spinner J.L., Winfree S., Shannon J.G. et al. *Yersinia pestis* survival and replication within human neutrophils phagosomes and uptake of infected neutrophils by macrophages. *J. Leukocyte Biology.* March 2014, 95.
50. Westermark L., Fahgren A., Fallman M. *Yersinia pseudotuberculosis* efficiently escapes polymorphonuclear neutrophils during early infection. *Infect. Immun.* 2014, 82 (3): 1181-1191.

Поступила 15.04.17

Контактная информация: Сомова Лариса Михайловна, д.м.н., проф.,
690087, Владивосток, ул. Сельская, 1, р.т. (423)244-14-38