

И.А. Шурыгина, А.В. Воропаев

**ВЛИЯНИЕ ШТАММОВ *Y. PSEUDOTUBERCULOSIS*, ЛПС И СУПЕРАНТИГЕНА YPMa *Y. PSEUDOTUBERCULOSIS* НА ПРОДУКЦИЮ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ИММУНОЦИТОКИНОВ КУЛЬТУРОЙ КЛЕТОК ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ ДОНОРОВ \***

*Институт эпидемиологии и микробиологии ГУ НЦ МЭ ВСНЦ СО РАМН (Иркутск)*

*В работе изучено влияние штаммов *Y. pseudotuberculosis* с различным плазмидным спектром, а также липополисахарида и суперантигена *Y. pseudotuberculosis* на продукцию провоспалительных иммуноцитокінов. Доказано, что максимальным стимулирующим эффектом из исследуемых субстанций обладает суперантиген *Y. pseudotuberculosis*, вторым по активности является липополисахарид. Штамм *Y. pseudotuberculosis* (82:47 MDa) обладает наименьшим стимулирующим эффектом.*

**Ключевые слова:** псевдотуберкулез, суперантиген, плазида, цитокин

**INFLUENCE OF *Y. PSEUDOTUBERCULOSIS*, LPS AND SUPER-ANTIGEN YPMa OF *Y. PSEUDOTUBERCULOSIS* ON PRODUCTION OF PROINFLAMMATORY IMMUNOCYTOKINES BY BLOOD CELLS CULTURE OF DONORS**

I.A. Shurygina, A.V. Voropayev

*Institute of Epidemiology and Microbiology SC ME ESSC SB RAMS, Irkutsk*

*We investigated the influence of *Y. pseudotuberculosis*, LPS and superantigen YPMa of *Y. pseudotuberculosis* on production proinflammatory immunocytokines by blood cells culture of donors. The maximum effects has super-antigen YPMa, in second place – LPS of *Y. pseudotuberculosis*. Stain *Y. pseudotuberculosis* (82:47 MDa) has minimum stimulatory effects.*

**Key words:** *pseudotuberculosis, super-antigen, plasmid, cytokine*

Течение инфекционного процесса, степень тяжести и многообразие клинической симптоматики в значительной мере обусловлены иммуногенностью возбудителя. Клиническая картина и особенности течения инфекционных заболеваний напрямую зависят от уровней продукции про- и противовоспалительных цитокинов и их влияния на иммунорегуляторные и эффекторные иммунные механизмы. В настоящее время доказана ведущая роль провоспалительных цитокинов и баланса их с антагонистами в выраженности и направленности системной воспалительной реакции [1, 2]. В то же время в литературе имеется мало информации о динамике цитокинопродукции при псевдотуберкулезе.

**ЦЕЛЬ**

Исследовать влияние штаммов *Y. pseudotuberculosis* и различных факторов патогенности возбудителя на синтез иммуноцитокінов.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ**

В работе использованы следующие штаммы:

- штамм *Y. pseudotuberculosis* № 890, содержащий плазмиду pYV 47 MDa;
- штамм *Y. pseudotuberculosis* № 8, содержащий плазмиды 82:47 MDa;
- штамм *Y. pseudotuberculosis* № 890-Д, не содержащий плазмид;

- штамм *Y. enterocolitica* № 15, содержащий плазмиду pYV 47 MDa.

Для оценки влияния различных факторов патогенности *Y. pseudotuberculosis* на продукцию иммуноцитокінов мы исследовали уровни IL-1, IL-6, TNF-α и IFN-α в культуре клеток цельной крови доноров (контроль) и под действием ЛПС *Y. pseudotuberculosis*, супернатанта, содержащего суперантиген YPMa *Y. pseudotuberculosis*, живых штаммов иерсиний: *Y. pseudotuberculosis* (82:47 MDa), *Y. pseudotuberculosis* (47 MDa), бесплазмидного штамма *Y. pseudotuberculosis* (pYV-) и *Y. enterocolitica* (47 MDa). Уровень выработки исследуемых цитокинов определяли методом ИФА в супернатанте культуры клеток цельной крови доноров после суточной инкубации совместно с исследуемыми субстанциями.

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В первой серии опытов мы выбрали концентрацию суперантигена YPMa, которая вызывала бы наибольшую выработку IFN-α (табл. 1).

Поскольку только концентрация, эквивалентная дозе *Y. pseudotuberculosis* 10<sup>6</sup> м.к./мл, вызывала достоверное изменение продукции IFN-α культурой клеток цельной крови доноров по сравнению с контролем, в дальнейшем мы использовали именно эту концентрацию суперантигена YPMa.

\* Работа выполнена в рамках гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых МД-1359.2006.7.

Во второй серии опытов мы определили концентрацию *Y. pseudo-tuberculosis* (82:47 MDa), которая вызывала бы максимальное изменение уровня продукции IL-1, IL-6 и TNF-α (табл. 2).

Как видно из таблицы 2, *Y. pseudotuberculosis* (82:47 MDa) в концентрации 10<sup>6</sup> м.к./мл достоверно больше стимулирует выработку исследуемых цитокинов по сравнению с контролем. В то время как под влиянием *Y. pseudotuberculosis* (82:47 MDa) в дозе 10<sup>3</sup> м.к./мл уровень продукции цитокинов достоверно не менялся. В дальнейшем мы использовали для всех штаммов дозу возбудителя, равную 10<sup>6</sup> м.к./мл.

Таким образом, подобранные для эксперимента дозы суперантигена YPMa и *Y. pseudotuberculosis* (82:47 MDa) оказались идентичными.

В предварительных исследованиях мы показали, что ЛПС в концентрации 5 – 10 мкг/мл значительно влияет на активность фагоцитоза культуры мононуклеарных фагоцитов селезенки крыс, тогда как при дозе ЛПС 2.5 мкг/мл достоверных отличий по сравнению с контролем не зарегистрировано. В дозе 20 – 30 мкг/мл ЛПС угнетает фагоцитоз (поглощение и респираторный взрыв) мононуклеарных фагоцитов. Поскольку при получении ЛПС по методу Вестфала в модификацией В.А. Кульшина с

соавт. [3], выход ЛПС составляет 5 %, концентрация 5 мкг/мл получается из 10<sup>7</sup> убитых микробных клеток, поэтому доза ЛПС 5 мкг/мл эквивалентна количеству ЛПС, поступившем в кровь при гибели в крови 10<sup>7</sup> м.к./мл возбудителя. Именно эта доза и была использована в дальнейших экспериментах.

Нами выявлено, что продукция иммуноцитоклинов под влиянием одноплазмидного штамма *Y. pseudotuberculosis* (47 MDa) характеризовалась несинхронной стимуляцией с преобладанием провоспалительных иммуноцитоклинов (рис. 1). Влияние бесплазмидного деривата *Y. pseudotuberculosis* (pYV –) и *Y. enterocolitica* (47 MDa) не отличалось от воздействия *Y. pseudotuberculosis* (47 MDa).

Продукция IL-1 под влиянием двухплазмидного штамма *Y. pseudotuberculosis* (82:47 MDa) (рис. 2) была достоверно снижена по сравнению с *Y. pseudotuberculosis* (47 MDa) и *Y. pseudotuberculosis* (pYV –), такая же тенденция отмечалась в отношении IL-6 и TNF-α. Уровень IFN-α при воздействии *Y. pseudotuberculosis* (82:47 MDa) не отличался от контроля.

Выраженным стимулирующим эффектом на продукцию иммуноцитоклинов обладал ЛПС *Y. pseudotuberculosis* (рис. 3). Однако максимальной

**Таблица 1**  
Зависимость уровня продукции IFN-α культурой клеток цельной крови доноров от концентрации суперантигена YPMa

Концентрация суперантигена YPMa (в эквивалентной дозе <i>Y. pseudotuberculosis</i> в 1 мл крови)	Концентрация IFN-α, пкг/мл
Контроль	14,2 ± 1,4
10 <sup>3</sup>	18,7 ± 1,9
10 <sup>6</sup>	39,3 ± 4,0*

Примечание: \* – достоверность различий, по сравнению с контролем (p < 0,002)

**Таблица 2**  
Продукция IL-1, IL-6 и TNF-α в культуре клеток цельной крови доноров в зависимости от концентрации *Y. pseudotuberculosis* (82:47 MDa)

Группа	Концентрация, пкг/мл		
	IL-1	IL-6	TNF-α
Контроль	42,3 ± 4,7	55,9 ± 6,2	41,8 ± 4,2
<i>Y. pseudotuberculosis</i> 10 <sup>3</sup> м.к./мл	45,2 ± 4,9	54,3 ± 6,0	40,2 ± 4,2
<i>Y. pseudotuberculosis</i> 10 <sup>6</sup> м.к./мл	81,7 ± 9,4*	214,3 ± 22,7*	79,2 ± 8,1*

Примечание: \* – достоверность различий по сравнению с контролем при уровне значимости p < 0,05.

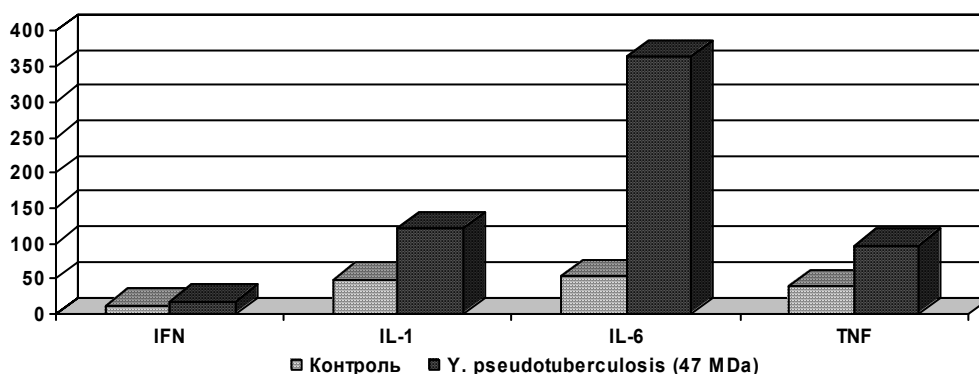


Рис. 1. Продукция иммуноцитоклинов под влиянием *Y. pseudotuberculosis* (47 MDa) по сравнению с контролем.

продукция иммуноцитокінов была под воздействием суперантигена *Y. pseudotuberculosis* (рис. 4).

В ходе исследования нами оценена роль суперантигена YPMa *Y. pseudotuberculosis* в патогенезе псевдотуберкулеза. YPMa значительно увеличивал продукцию IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  культурой клеток цельной крови, что соответствует свойствам суперантигенов [10], причем эффект был дозозависимым – суперантиген в дозе, эквивалентной  $10^3$  м.к./мл не вызывал значимых изменений в уровне продукции IFN- $\alpha$  по сравнению с контролем, а в дозе, эквивалентной  $10^6$  м.к./мл, достоверно увеличивал выра-

ботку иммуноцитокіна. То есть необходим минимальный уровень бактериемии для представления моноцитам периферической крови достаточного количества суперантигена *Y. pseudotuberculosis*, вследствие чего иммунокомпетентными клетками продуцируются провоспалительные цитокины.

Суперантиген обладает большим потенциалом на продукцию иммуноцитокінов, чем живая культура *Y. pseudotuberculosis* в эквивалентных количествах.

По сравнению с ЛПС (в дозе, эквивалентной  $10^7$  м.к./мл возбудителя), стимулирующий эффект

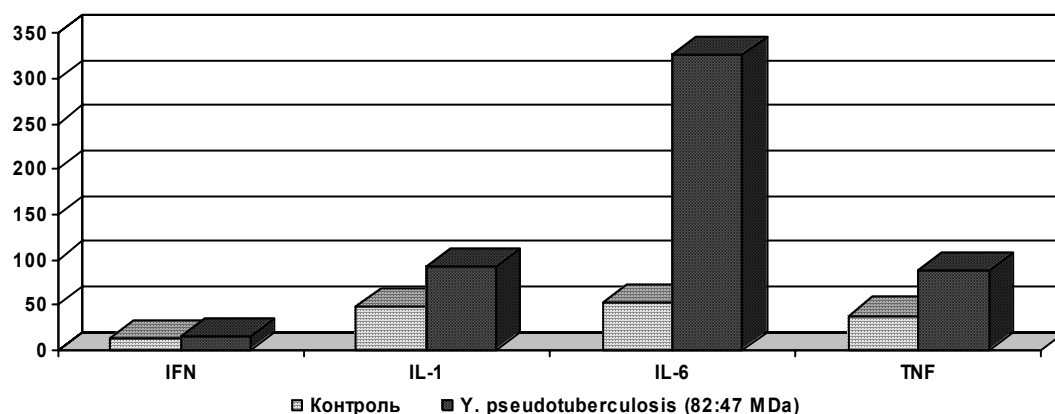


Рис. 2. Продукция иммуноцитокінов под влиянием *Y. pseudotuberculosis* (82 : 47 MDa) по сравнению с контролем.

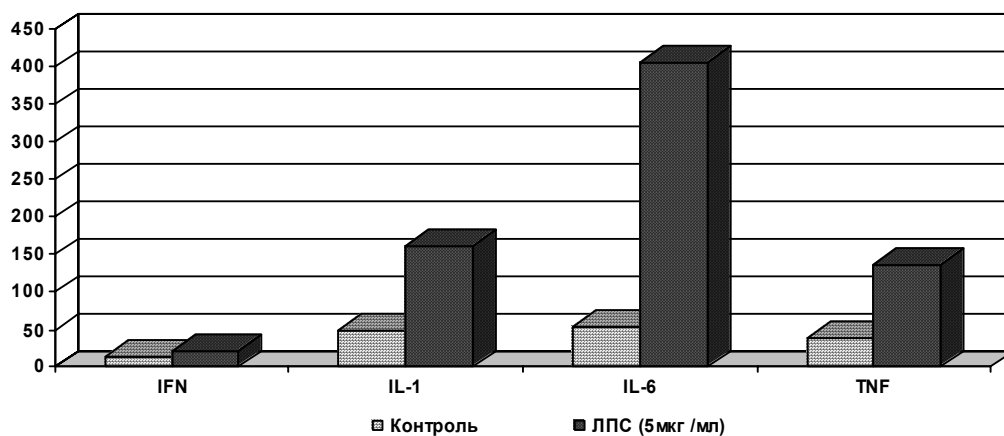


Рис. 3. Продукция иммуноцитокінов под влиянием ЛПС по сравнению с контролем.

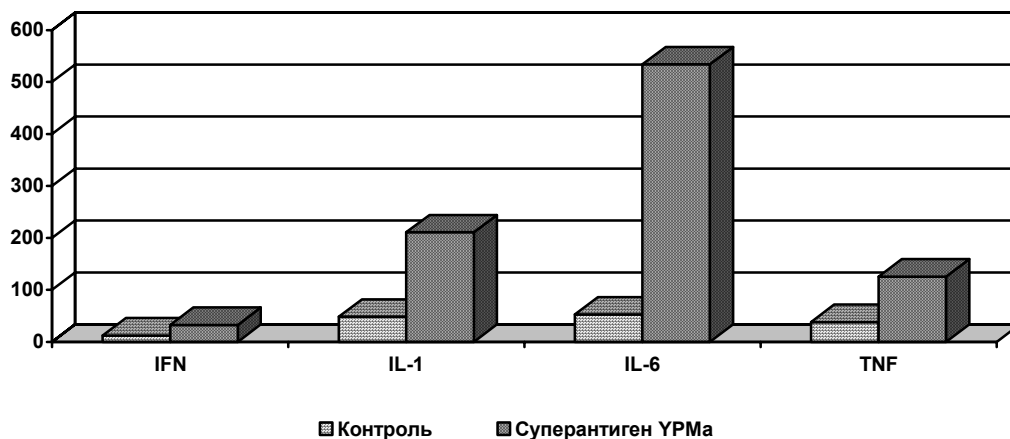


Рис. 4. Продукция иммуноцитокінов под влиянием суперантигена по сравнению с контролем.

Таблица 3

Сравнительная характеристика продукции провоспалительных иммуноцитоклинов культурой клеток цельной крови доноров под влиянием штаммов иерсиний, суперантигена YPMa и ЛПС *Y. pseudotuberculosis*

Группа	Концентрация, пкг/мл		
	IL-1	IL-6	TNF- $\alpha$
Контроль, M $\pm$ m	48,3 $\pm$ 4,0	52,7 $\pm$ 28,1	38,3 $\pm$ 5,7
<i>Y. pseudotuberculosis</i> (47 MDa), M $\pm$ m	120,7 $\pm$ 3,1 <sup>ac</sup>	363,6 $\pm$ 5,9 <sup>a</sup>	96,8 $\pm$ 8,6 <sup>a</sup>
<i>Y. pseudotuberculosis</i> (82:47 MDa), M $\pm$ m	91,6 $\pm$ 10,1 <sup>a</sup>	326,7 $\pm$ 39,3 <sup>a</sup>	88,4 $\pm$ 10,6 <sup>a</sup>
<i>Y. pseudotuberculosis</i> (pYV-), M $\pm$ m	114,2 $\pm$ 2,3 <sup>ac</sup>	358,3 $\pm$ 3,2 <sup>a</sup>	95,6 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>
<i>Y. enterocolitica</i> (47 MDa), M $\pm$ m	103,9 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	353,9 $\pm$ 2,9 <sup>a</sup>	97,4 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>
ЛПС (5 мкг/мл), M $\pm$ m	161,3 $\pm$ 7,2 <sup>abc</sup>	405,4 $\pm$ 9,4 <sup>abc</sup>	135,3 $\pm$ 5,2 <sup>ac</sup>
Суперантиген YPMa, M $\pm$ m	210,8 $\pm$ 12,1 <sup>ac</sup>	533,8 $\pm$ 21,2 <sup>ac</sup>	125,8 $\pm$ 4,0 <sup>ac</sup>

**Примечание:** a – достоверность различий по сравнению с контролем при уровне значимости  $p < 0,05$ ; b – достоверность различий в уровне стимуляции иммуноцитоклинов ЛПС по сравнению со стимуляцией суперантигеном YPMa *Y. pseudotuberculosis* при уровне значимости  $p < 0,05$ ; c – достоверность различий относительно уровня, индуцированного *Y. pseudotuberculosis* (82:47 MDa) при уровне значимости  $p < 0,05$ .

YPMa (в дозе, эквивалентной дозе  $10^6$  м.к./мл) на продукцию IL-1, IL-6, IFN- $\alpha$ , был достоверно выше, что указывает на патогенетическую роль суперантигена при немассивной бактериемии. При массивной бактериемии, сопровождающейся гибелью микроорганизмов и высвобождением большого количества эндотоксина (ЛПС), пусковым механизмом гиперпродукции IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  является ЛПС [4, 5, 8]. Это указывает на разницу в патогенетических процессах под действием эндотоксина (интоксикация) и суперантигена (иммунопатологические осложнения и генерализация заболевания) и на более позднюю активацию лимфоцитов, чем макрофагов суперантигенами, что согласуется с данными Н. Muller-Alouf et al. [7] для суперантигена *Streptococcus pyogenes*.

С учетом данных о наличии анти-YPM IgG антител к YPMa при псевдотуберкулезе у больных в острый период заболевания, а также связь уровней анти-YPM IgG с системными проявлениями инфекции [6, 9], можно сделать вывод, что суперантиген YPMa является ведущим фактором в патогенезе иммунопатологических осложнений при псевдотуберкулезе, а способность к генерализации псевдотуберкулеза связана с продукцией YPMa.

Сравнительная характеристика влияния живых штаммов *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* (в количестве, равном  $10^6$  м.к./мл), ЛПС *Y. pseudotuberculosis* (в концентрации 5 мкг/мл) и суперантигена YPMa (в дозе, эквивалентной  $10^6$  м.к./мл) на продукцию провоспалительных иммуноцитоклинов культурой клеток цельной крови доноров отражена в таблице 3.

Таким образом, все исследуемые субстанции вызывали значимое повышение концентрации провоспалительных иммуноцитоклинов по сравнению с контролем. Наибольший стимулирующий эффект отмечался в отношении IL-6. Максимальный стимулирующий эффект наблюдался под влиянием суперантигена YPMa (превышение уровня IL-1 в 4,36 раза по отношению к контролю, IL-6 – в 10,13 раза, TNF-

$\alpha$  – в 3,28 раза). На втором месте по силе стимулирующего воздействия стоял ЛПС (превышение уровня IL-1 в 3,34 раза по отношению к контролю, IL-6 – в 7,69 раза, TNF- $\alpha$  – в 3,53 раза). Наименьшим стимулирующим эффектом среди исследуемых образцов обладал *Y. pseudotuberculosis* (82:47 MDa) (превышение уровня IL-1 в 1,90 раза по отношению к контролю, IL-6 – в 6,20 раза, TNF- $\alpha$  – в 2,31 раза).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Кетлинский С.А. Цитокины и их антагонисты: теория и практика / С.А. Кетлинский, А.М. Ищенко // Медицинская иммунология. – 1999. – Т. 1, № 3–4. – С. 16.
2. Ковальчук Л.В. Новые возможности лечения цитокинами: иммуноцитоклины в локальной иммунокоррекции / Л.В. Ковальчук, Л.В. Ганковская // Intern. J. Immunorehabilitation. – 1997. – № 6. – С. 57–60.
3. Улучшенный метод выделения липополисахаридов из грамотрицательных бактерий / В.А. Кульшин, А.П. Яковлев, С.Н. Аваева и др. // Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология. – 1987. – № 5. – С. 44–46.
4. Casey L. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome / L. Casey, R. Balk, R. Bone // Ann. Intern. Med. – 1993. – Vol. 119. – P. 771–778.
5. Circulating inflammatory mediators in patients with fever: predicting bloodstream infection / B. Groeneveld, A. Bossink, G. Mierlo et al. // Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. – 2001. – Vol. 8, № 6. – P. 1189–1195.
6. Clinical role for a superantigen in *Yersinia pseudotuberculosis* infection / J. Abe, M. Onimaru, S. Matsumoto et al. // J. Clin. Invest. – 1997. – Vol. 99, № 8. – P. 1823–1830.
7. Comparative study of cytokine release by human peripheral blood mononuclear cells stimulated with *Streptococcus pyogenes* superantigenic erythrogenic toxins, heat-killed streptococci, and

lipopolysaccharide / H. Muller-Alouf, J. Alouf, D. Gerlach et al. // *Infect. Immun.* — 1994. — Vol. 62, N 11. — P. 4915–4921.

8. Plasma levels of cytokines in primary septic shock in humans: correlation with disease severity / B. Gardlund, J. Sjolín, A. Nilsson et al. // *J. Infect. Dis.* — 1995. — Vol. 172. — P. 296–301.

9. Ueshiba H. Analysis of the superantigen-producing ability of *Yersinia pseudotuberculosis*

strains of various serotypes isolated from patients with systemic or gastroenteric infections, wildlife animals and natural environments / H. Ueshiba, H. Kato, T. Miyoshi-Akiyama // *Zentralbl. Bakteriол.* — 1998. — Vol. 288, N 2. — P. 277–291.

10. Vb-specific stimulation of human T cells by staphylococcal toxins / J. Kappler, B. Kotzin, L. Herron et al. // *Science.* — 1989. — Vol. 244. — P. 811–813.