### Последствия интернализации и фагоцитоза листерий при инфекционном процессе

Одинцов Ю.Н., Перельмутер В.М.

# Consequences of internalization and phagocytosis of Listeria during an infectious process

Odintsov Yu.N., Perelmuter V.M.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Одинцов Ю.Н., Перельмутер В.М.

В статье обсуждаются последствия интернализации и фагоцитоза листерий в зависимости от типа рецепторов гепатоцитов и макрофагов (Met, gC1q-R, C3b-R, Fc-R). Предполагается, что вариант интернализации и фагоцитоза зависит от стадии иммуногенеза (индуктивная, синтеза IgM, синтеза IgG), развивающегося при инфекционном процессе. Утверждается, что механизм интернализации и фагоцитоза является альтернативным и определяет судьбу возбудителя в гепатоците и макрофаге, а также вероятность формирования гранулем и их обратного развития.

**Ключевые слова:** интернализация, IgM, IgG, фагоцитоз, гранулема.

In the article there have been discussed the consequences of Listeria internalization and phagocytosis depending on hepatocyte and macrophage receptors type (Met, gC1q-R, C3b-R, Fc-R). It has been supposed that internalization and phagocytosis variant depended on the stage (inductive stage, IgM synthesis stage, IgG synthesis stage) of immunogenesis developing during an infectious process. It has been stated that internalization and phagocytosis mechanism was alternative and defined the destiny of a causative agent in hepatocyte and macrophage as well as the possibility of granulomas formation and of their reverse development.

Key words: internalization, IgM, IgG, phagocytosis, granuloma.

УДК 616-002.72:616.155.3-008.13

#### Введение

Актуальность изучения патогенеза листериоза обусловлена многими факторами. Во-первых, время

от времени повторяются вспышки листериоза среди сельскохозяйственных животных и людей. Во-вторых, листериоз оказался удобной и широко используемой моделью инфекционного процесса с формированием «клеточного» типа иммунного ответа. Вместе с тем многие закономерности иммуногенеза, выявленные в последние годы в неифекционной иммунологии, не учитываются должным образом при изучении иммунного ответа, возникающего в динамике инфекционного заболевания.

Как известно, листерии являются факультативными анаэробами, вызывающими развитие гранулематозного заболевания [6]. Входными воротами чаще всего является желудочнокишечный тракт (ЖКТ). Местом переживания листерий в макроорганизме являются гепатоциты (одно из первоначальных названий возбудителя — Listerella hepatolytica) [24] и макрофаги, а причиной развития гранулем — незавершенный макрофагальный фагоцитоз. Представляет интерес изучение процесса поглощения бактерий «профессиональными» (макрофаг) и «непрофессиональными» (гепатоцит) фагоцитами на разных стадиях иммуногенеза, развивающегося в динамике инфекционного заболевания.

Целью работы является рассмотрение трех основных механизмов интернализации листерий гепатоцитами и фагоцитоза макрофагами: в отсутствии антител, при появлении IgM и, наконец, при накоплении IgG.

# Интернализация листерий гепатоцитами их фагоцитоз макрофагами в условиях отсутствия антител

Термины «фагоцитоз» и «интернализация», когда речь идет о бактериях, часто используются как синонимы. Между тем механизм попадания бактерий

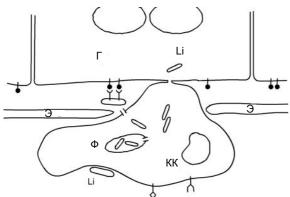
в клетки макроорганизма принципиально отличается в зависимости от того, обладают они или не обладают активной фагоцитарной способностью. Поглощение листерий макрофагами в их естественном микроокружении является процессом, инициируемым фагоцитом. Наличие плазмы в начальный период заболевания, а в последующем и специфических антител разных классов, существенно влияет как на судьбу поглощаемых бактерий, так и на течение заболевания. Такое активное, с участием опсонинов различной природы, поглощение бактерий специализированными клетками обозначается термином «фагоцитоз».

По внешним признакам близким к процессу фагоцитоза является поглощение бактерий эпителиальными элементами, обозначаемыми в литературе как «непрофессиональные фагоциты». Между тем этот процесс инициируется не соматической клеткой, а самими бактериями, осуществляющими эволюционно возникшую и закрепленную способность паразита проникать внутрь клеток, где они находят оптимальную среду при развитии инфекционного процесса. Взаимодействие бактерий с соматическими клетками осуществляется благодаря лиганд-рецепторному механизму. В роли рецепторов на поверхности клетокмишеней бактерии «используют» рецепторы к различным метаболитам или медиаторам межклеточных взаимодействий. Такой вариант попадания бактерий внутрь клетки без участия опсонинов, в отличие от фагоцитоза, и следует называть интернализацией.

Механизм взаимодействия листерий с энтероцитами и преодоления ими кишечного барьера недостаточно изучен. Судя по отсутствию энтеральной формы листериоза [7] у человека при энтеральном заражении, листерии преодолевают кишечный барьер, не приводя к альтерации, способной вызвать воспалительную реакцию. При энтеральном инфицировании животных также отсутствовали какие-либо существенные морфологические изменения со стороны ЖКТ [6]. По-видимому, быстрое проникновение через кишечную стенку происходит благодаря лиганд-рецепторному взаимодействию листерий с энтероцитами, их интернализации, проникновению в собственную пластинку слизистой, а затем в лимфатическую и кровеносную системы. По нашим данным [2, 3], у мышей и кроликов листерии обнаруживаются в крови и гепатоцитах животных через 24 ч после энтерального заражения.

Листерии проникают в гепатоциты также благодаря лиганд-рецепторному взаимодействию. Функцию лигандов у листерий выполняют поверхностные протеины: интерналины InIA и InIB [11, 15], принадлежащие к семейству LPXTG-протеинов [21]. InIA состоит из 800 аминокислотных остатков. InIB — протеин, содержащий богатые лейцином повторы, имеет 630 аминокислотных остатков [15]. К семейству интерналинов листерий относят и InIC, содержащий 297 аминокислотных остатков [19]. Интерналины запускают процесс проникновения бактерий путем взаимодействия с рецептором фактора роста гепатоцитов (Met) и двумя другими клеточными компонентами: gC1q-R и протеогликанами [8].

В результате взаимодействия интерналинов листерий с рецепторами гепатоцитов листерии попадают в формирующуюся фагосому (рис. 1).



Фагоцитоз листерий клетками Купфера в преиммунную стадию инфекционного процесса (при отсутствии специфических IgM и IgG) сопровождается продукцией пор-формирующего листериолизина (LLO), выходом возбудителя в цитозоль, а затем в пространство Диссе. Проникновение листерий в гепатоциты осуществляется либо через интерналин-рецепторное взаимодействие, либо через пору, образованную LLO в цитолемме клетки Купфера и в смежной зоне клеточной мембраны гепатоцита.

Поглощение листерий макрофагами в преиммунную фазу инфекционного процесса протекает в условиях отсутствия или недостатка специфических опсонинов. Механизмы адгезии и поглощения листерий в этих условиях остаются малоизученными.

После формирования фагосом, содержащих живые листерии, дальнейшие события в гепатоцитах и макрофагах (купферовых клетках) в индуктивную стадию антителогенеза развиваются одинаково. Благодаря листериолизину, формирующему пору, действующему при непосредственном контакте листерий с мембраной клетки, листерии вскоре выходят из фагосомы, не разрушая мембраны [16, 22]. Оптимальная активность LLO проявляется при кислом (6,0) значении рН [16]. Адаптация листерий к кислой среде усиливает их способность к внутриклеточному выживанию как в вакуолях, так и в цитоплазме [10]. В выходе листерий из вакуолей принимает участие еще один фактор — PrfA-протеин, роль которого не вполне ясна [20].

LLO, относящийся к семейству холестеролзависимых цитолизинов, играет важнейшую роль в вирулентности листерий [12, 16, 17]. Его продукция контролируется геном hlyA. Моноклональные антитела к листериолизину повышают резистентность животных, инфицированных листериями [18]. Накопление LLO в цитозоле клетки могло бы привести к ее гибели. Однако этого не происходит. В молекуле LLO содержится PEST (Р — Pro, E — Glu, S — Ser, T — Thr) — аминокислотная последовательность. Показано, что в цитозоле свободный LLO, имеющий эту аминокислотную последовательность, инактивируется, благодаря чему клетки не погибают, а листерии находят в цитозоле оптимальную нишу для своего размножения [14].

Наличие у листерий гексозо-фосфаттранслоказы (Hpt), аналогичной транслоказе соматических клеток млекопитающих, позволяет им использовать гексозофосфаты клетки хозяина для глюконеогенеза и гликогенолиза, что обеспечивает быструю внутриклеточную пролиферацию листерий в цитозоле [9].

В цитозоле соматической клетки еще один поверхностный протеин листерий — ActA — индуцирует полимеризацию актина у одного из полюсов бактерии и способствует перемещению листерий внутри цитозоля. Подобный же механизм лежит и в основе распространения листерий от клетки к клетке [11, 13, 23]. Продукция ActA листериями при выходе в цитозоль увеличивается в 200 раз [25]. В течение первого часа бактерия окружается цитоплазматическими актиновыми филаментами (Fактин). Через 3 ч начинают формироваться длинные выступы F-актина около одного из концов бактерии. Движение бактерий связано с формированием этих F-актиновых выступов. Актиновые филаменты быстро образуют позади бактерий «актиновые хвосты», достигающие длины до 40 мкм, благодаря сокращению которых листерии мигрируют через цитоплазму клетки-хозяина. Движение бактерий через цитоплазму происходит быстро: со скоростью 0,12—1,46 мкм/с, позволяя бактериям продвигаться к клеточной мембране, а затем распространяться от клетки к клетке [13].

Таким образом, последствием описанного варианта интернализации листерий гепатоцитами и их фагоцитоза макрофагами в условиях отсутствия специфических IgM и IgG, по-видимому, является «ускользание» листерий от переваривания. Используя этот механизм, бактерии попадают в условия, оптимальные для выживания, рекомбинативной изменчивости [16] и размножения. Вместе с тем для организма хозяина этот период инфекционного процесса характеризуется высокой степенью инфицирования гепатоцитов листериями и их повреждения. Гистогематический барьер печени, включая клетки Купфера, в этот период оказывается несостоятельным.

## Интернализация листерий гепатоцитами и их фагоцитоз макрофагами в условиях продукции IgM — противолистерийных антител

Появляющиеся специфические IgM-антитела, связываясь с поверхностными антигенами листерий, опосредуют, по крайней мере, три эффекта: активацию комплемента по классическому пути и лизис бактерий, опсонизацию листерий через активацию комплемента с образованием на поверхности бактерий блока C1qrs4b23b, экранирование интерналинов листерий при их опсонизации (рис. 2).

По-видимому, фагоцитоз листерий опсонизированных комплексом IgM-C1qrs4b23b клетками Купфера через рецепторы к С3b приводит к длительному пребыванию бактерий в фагосоме. Вопервых, это обусловлено тем, что фагоцитоз, опосредованный рецептором к С3b, не сопровождается образованием супероксидных и нитроксидных (СОР, НОР) радикалов [1, 5]. Бактерии остаются жизнеспособными и недоступными действию лизосомальных ферментов. Во-вторых, IgM могут блокировать секрецию LLO из листерий

тем самым препятствовать их выходу в цитозоль клетки Купфера, с последующим проникновением в пространство Диссе. В результате этого про-

цесса, а также экранирования интерналинов листерии оказываются неспособными инфицировать гепатоциты.

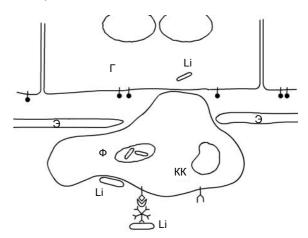


Рис. 2. Интернализация листерий гепатоцитами и фагоцитоз клетками Купфера (макрофагами) в условиях образования специфических IgM-антител. Условные обозначения см. рис. 1

Фагоцитоз листерий клетками Купфера в IgMстадию иммунного ответа имеет незавершенный характер. Продукция листериями LLO если и происходит, то не сопровождается его секрецией, образованием пор в мембране фагосомы, выходом возбудителя в цитозоль. Проникновение листерий в гепатоциты через интерналинрецепторное взаимодействие оказывается экранированным.

Итак, появление IgM-антител приводит к незавершенному фагоцитозу листерий клетками Купфера, что, в свою очередь, должно привести к синтезу ИЛ-12, развитию Th-1 типа иммунного ответа и созданию условий для развития гранулем в синусоидах печени. IgM-опосредованные эффекторные реакции (экранирование интерналинов листерий и процесс формирования гранулем) ограничивают способность листерий преодолевать гистогематический барьер и в значительной степени уменьшают вероятность инфицирования гепатоцитов листериями на фоне продолжающейся бактериемии

### Интернализация листерий гепатоцитами и их фагоцитоз макрофагами в условиях

### продукции IgG — противолистерийных антител

Смена синтеза противолистерийных IgMантител на IgG-антитела изменяет не только условия адгезии листерий гепатоцитами и клетками Купфера, но и последствия попадания бактерий внутрь этих клеток (рис. 3).

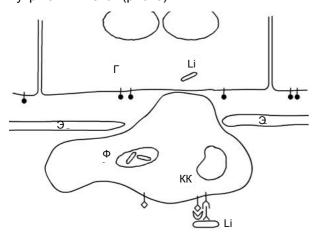


Рис. 3. Интернализация листерий гепатоцитами и фагоцитоз клетками Купфера (макрофагами) в условиях образования специфических IgG-антител. Условные обозначения см. рис. 1

Фагоцитоз листерий клетками Купфера в IgGстадию иммунного ответа имеет завершенный характер. Секреция листериями LLO, как и в стадию IgM иммунного ответа, не происходит. Вследствие этого блокируется LLOопосредованный трансцеллюлярный механизм распространения листерий. Проникновение листерий гепатоциты через интерналинрецепторное взаимодействие также оказывается экранированным.

Как известно, IgG-антитела являются единственными иммуноглобулинами, обладающими выраженным опсонизирующим эффектом, приводящим к завершенности фагоцитоза [1, 5]. Опсониза-ЦИЯ листерий происходит как за счет взаимодействия Fab-фрагментов IgG с поверхностными антигенами листерий, так и благодаря связыванию комплемента с Fc-фрагментом IgG. Адгезия опсонизированных листерий к клеткам Купфера опосредована и рецепторами к Fc-фрагменту IgG, и рецепторами к C3b. Фагоцитоз листерий, опсонизированных таким образом, должен сопровождаться ферментативным вычленением тафтсина из аминокислотной последовательности Fсфрагмента IgG [4], активацией COP, HOP и киллингом бактерий [5]. Это исключает возможность длительного пребывания листерий в фаголизосомах клеток Купфера, их выход в цитозоль. Как и в стадию образования и преобладания IgM-антител, опсонизация листерий IgG-антителами и комплементом не только блокирует выход бактерий в цитозоль и пространство Диссе, но и препятствует взаимодействию рецепторов гепатоцитов с интерналинами листерий.

Таким образом, в IgG-стадию иммунного ответа завершенный фагоцитоз листерий клетками Купфера должен препятствовать продукции ими ИЛ-12, дифференцировке in situ Th1-лимфоцитов, синтезу соответствующего набора цитокинов и возможности формирования новых гранулем. Вероятность инфицирования гепатоцитов листериями через интерналин-рецепторное взаимодействие остается низкой.

Механизмы интернализации листерий гепатоцитами и их фагоцитоз клетками Купфера (как и другими макрофагами) имеют определенные условия реализации и ограничения, зависящие от динамики инфекционного процесса и в первую очередь от стадии иммуногенеза. В условиях естественно развивающегося листериоза иммуногенез имеет смешанный характер: наряду с активацией Th1-лимфоцитов и макрофагов развивается тимусзависимый гуморальный иммуногенез на поверхностные антигены листерий с характерной для него сменой стадий синтеза IgM- и IgGантител. Однако ведущее значение для адгезии и поглощения листерий имеет гуморальное звено иммунного ответа.

#### Заключение

Обсуждаемые в статье механизмы интернализации и фагоцитоза листерий позволяют сформулировать следующие дискуссионные положения:

1. Вариант механизма проникновения листерий в клетки хозяина зависит от стадии гуморального тимусзависимого антителогенеза: индуктивной, IgM- и IgG-стадий.

В индуктивную стадию реализуется интерналин-опосредованный механизм проникновения

листерий в гепатоциты через рецепторы Met и gC1q-R. В стадии синтеза IgM- и IgG-иммуноглобулинов этот механизм блокирован антителами, благодаря чему продолжение инфицирования гепатоцитов листериями, находящимися в кровотоке, резко ограничивается. Вместе с тем возможность перехода листерий в соседние гепатоциты сохраняется благодаря порформирующему механизму, опосредованному листериолизином.

Фагоцитоз листерий клетками Купфера в индуктивную стадию характеризуется незавершенностью благодаря быстрому выходу бактерий в цитозоль. В стадию IgM незавершенный фагоцитоз листерий, опсонизированных IgM и комплементом (через C3b-R), обусловлен отсутствием образования супероксидных и нитроксидных радикалов. Опсонизация листерий IgG-антителами приводит к их усиленному фагоцитозу (через Fc-R и C3b-R) и лизису.

- 2. Варианты механизмов проникновения листерий в гепатоциты и клетки Купфера в условиях инфекционного процесса альтернативны. В стадию IgM антителогенеза блокируется интерналин-опосредованный механизм проникновения листерий в гепатоциты, а в стадию IgG отменяются интерналиновый и опосредованный IgM механизмы попадания листерий в гепатоциты и клетки Купфера.
- 3. Вариант механизма поглощения листерий клетками Купфера определяет жизнеспособность листерий. В индуктивную стадию антителогенеза они переживают в цитозоле, в стадию IgM в фагосоме, а в IgG быстро гибнут.
- 4. Достаточно длительное пребывание листерий в фагосомах в IgM-стадию антителогенеза стимулирует продукцию ИЛ-12, Th1-ответ и в конечном итоге формирование гранулем.

#### Литература

- 1. *Маянский А.Н., Маянский Д.Н.* Очерки о нейтрофиле и макрофаге. Новосибирск: Наука, 1989. 341 с.
- Одинцов Ю.Н., Перельмутер В.М. В динамике листериоза происходит переключение типа биологического взаимодействия инфекта с организмом «хозяина» // Сибирский журнал гастроэнтерологии и гепатологии. 2001. < 12. С. 107—109.</li>
- 3. Одинцов Ю.Н., Перельмутер В.М. Инфекционный процесс как форма симбиоза популяций патогенных

- бактерий и человека // Сибирский медицинский журнал. 2002. < 1—2. С. 44—46.
- 4. Одинцов Ю.Н., Перельмутер В.М., Климентьева Т.К. Тафтсин: роль в развитии негранулематозных и гранулематозных бактериозов // Бюллетень сибирской медицины. 2002. Т. 1. < 3. С. 98—102.
- 5. *Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д.* Иммунология. М.: Мир, 2000. 581 с.
- 6. *Триполитова А.А., Борисова Г.В.* Листериоз. Томск: Изд-во ТГУ, 1965. 260 с.
- 7. *Цинзерлинг А.В.* Современные инфекции. Патологическая анатомия и вопросы патогенеза. СПб.: СОТИС, 1993. 363 с.
- Bierne H., Cossart P. InlB, a surface protein of Listeria monocytogenes that behaves as an invasin and a growth factor // Journal of Cell Science. 2002. 115. P. 3357—3367.
- Chico-Calero I., Suárez M., González-Zorn B. et al. Hpt, a bacterial homolog of the microsomal glucose-6-phosphate translocase, mediates rapid intracellular proliferation in Listeria // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. < 1. 99. P. 431—436.</li>
- 10. Conte M.P., Petrone G., Biase A. et al. Effect of Acid Adaptation on the Fate of Listeria monocytogenes in THP-1 Human Macrophages Activated by Gamma Interferon // Infection and Immunity. 2002. V. 70. < 8. P. 4369—4378.
- 11. Cossart P., Bierne H. The use of host cell machinery in the pathogenesis of Listeria monocytogenes // Curr. Opin. Immunol. 2001. < 13(1) P. 96—103.
- 12. Cossart P., Vicente M.F., Mengaud J. et al. Listeriolysin O is essential for virulence of Listeria monocytogenes: direct evidence obtained by gene complementation // Infection and Immunity. 1989. < 57(11). P. 3629—3636.</p>
- Dabiri G.A., Sanger J.M., Portnoy D.A., Southwick F.S. Listeria Monocytogenes Moves Rapidly Through the Host-Cell Cytoplasm by Inducing Directional Actin Assembly // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1990. V. 87. P. 6068—6072.
- 14. *Decatur A.L., Portnoy D.A.* A PEST-Like Sequence in Listeriolysin O Essential for Listeria monocytogenes Pathogenicity // Science. 2000. 290. P. 992—995.
- Dramsi S., Kocks C., Forestier C., Cossart P. Internalin-mediated invasion of epithelial cells by Listeria monocytogenes is regulated by the bacterial growth state, temperature and the pleiotropic activator prfA // Mol. Microbiol. 1993. < 9(5). P. 931—941.</li>
  Dramsi S., Cossart P. Listeriolysin O: a genuine cy-
- Dramsi S., Cossart P. Listeriolysin O: a genuine cytolysin optimized for an intracellular parasite // The Journal of Cell Biology. 2002. V. 156. < 6. P. 943—946.</li>
- 17. Dubail I., Berche P., Charbit A. Listeriolysin O as a Reporter To Identify Constitutive and In Vivo-Inducible Promoters in the Pathogen Listeria monocytogenes // Infection and Immunity. 2000. V. 68. < 6. P. 3242—3250.</p>
- 18. Edelson B.T., Cossart P., Unanue E.R. Cutting Edge: Paradigm Revisited: Antibody Provides Resistance to Listeria Infection // The Journal of Immunology. 1999. < 163.</p>
  - P. 4087—4090.
- 19. Engelbrecht F., Chun S.K., Ochs C. et al. A new PrfA-

### Одинцов Ю.Н., Перельмутер В.М.Последствия интернализации и фагоцитоза листерий при инфекционном процессе

- regulated gene of Listeria monocytogenes encoding a small, secreted protein which belongs to the family of internalins // Mol. Microbiol. 1996. < 21(4). P. 823—837.
- 20. Freitag N.E., Rong L., Portnoy D.A. Regulation of the prfA transcriptional activator of Listeria monocytogenes: multiple promoter elements contribute to intracellular growth and cell-to-cell spread // Infection and Immunity. 1993. V. 61. < 6. P. 2537—2544.
- 21. Garandeau C., Réglier-Poupet H., Dubail I. et al. The Sortase SrtA of Listeria monocytogenes Is Involved in Processing of Internalin and in Virulence // Infection and Immunity. 2002. V. 70. < 3. P. 1382—1390.
- 22. Portnoy D.A., Auerbuch V., Glomski I. J. The cell biology of Listeria monocytogenes infection: the intersec-

- tion of bacterial pathogenesis and cell-mediated immunity // The Journal of Cell Biology. 2002. V. 158. < 3. P. 409—414.
- 23. Sanger J.M., Sanger J.W., Southwick F.S. Host cell actin assembly is necessary and likely to provide the propulsive force for intracellular movement of Listeria monocytogenes. Infection and Immunity. 1992. V. 60. < 9. P. 3609—3619</p>
- 24. Seeliger H.P.R. Listeriose. Zweite neubearbeitete Auflag. Leipzig. 1958. S. 194.
- 25. Shetron-Rama L.M., Marquis H., Bouwer H.G.A., Freitag N.E. Intracellular Induction of Listeria monocytogenes actA Expression // Infection and Immunity. 2002. V. 70. < 3. P. 1087—1096.

Поступила в редакцию 04.07.2003 г.