

***LISTERIA MONOCYTOGENES*: РАСПРОСТРАНЕНИЕ И МЕХАНИЗМЫ ИММУННОГО ОТВЕТА**

И.Ф. Антошина¹, М.В. Мезенцева²

¹ФГБУ НИИЭМ имени Н.Ф. Гамалеи Минздравсоцразвития России, Москва

²ФГБУ НИИ вирусологии имени Д.И. Ивановского Минздравсоцразвития России, Москва

Резюме. Грамположительная бактерия *Listeria monocytogenes* (LM), вызывающая листериоз, является одним из патогенов, попадающих в наш организм с пищевыми продуктами. Листериоз является одной из старейших экспериментальных инфекций, а LM представляет собой классический объект для изучения механизмов клеточного иммунитета. Установлено, что вирулентная бактерия *L. monocytogenes* побуждает зараженные иммунные клетки уклоняться от защитного ответа. Нами проведена серия экспериментов, в которых были изучены изменения показателей иммунного ответа у мышей на разных этапах развития инфекции (в течение 3–5 суток), вызванной *L. monocytogenes* штамма EGDe (wt) и бактериями изогенных штаммов, с мутациями в генах, контролирующим продукцию PAMPs (d28, i28). Анализ литературных данных и полученных нами результатов позволяет заключить, что иммунный ответ при листериозе играет важную роль и зависит как от штамма возбудителя, так и от дозы бактерии и различных других условий заражения. Проведенные исследования могут быть полезны при выборе тактики лечения заболевания, вызванного *Listeria monocytogenes*, и, возможно, других заболеваний, вызываемых внутриклеточными бактериями

Ключевые слова: *Listeria monocytogenes*, листериоз, иммунитет, цитокины, интерлейкины, интерфероны.

***LISTERIA MONOCYTOGENES*: SPREADING AND MECHANISMS OF IMMUNE RESPONSE**

Antoshina I.F., Mezentseva M.V.

Abstract. Gram-positive bacteria *Listeria monocytogenes* (LM) the causative agent of listeriosis is one of the pathogens entering to the human organism by food products. The listeriosis is one of the oldest experimental infection and LM is the classic object for study of cell immunity mechanisms. It was established that virulent bacteria *L. monocytogenes* induce infected immune cells to avoid own protective response. The authors conducted experiments to study changes in immune response indicators in mice in the different stages of infection (during 3–5 days) caused by *L. monocytogenes* EGDe (wt) strain and bacteria of isogenic strains with mutations in genes controlled production of PAMPs (d28, i28). Analysis of published data and obtained results of this study allows to make a conclusion that immune response in listeriosis plays an important role and it depends on pathogen strain, bacteria doses and another condition of infection. Conducted study can be useful in case of choosing of treatment tactic of disease caused by *Listeria monocytogenes*, and, probable another diseases, caused by intracellular bacteria. (*Infekc. immun.*, 2012, vol. 2, N 3, p. 627–634)

Key words: *Listeria monocytogenes*, listeriosis, immunity, cytokines, interleukins, interferon.

Грамположительная бактерия *Listeria monocytogenes* (LM), вызывающая листериоз, является одним из патогенов, попадающих в наш организм с пищевыми продуктами [2, 3, 21, 42]. LM присутствует в нормальной флоре среднего и нижних отделов кишечника многих видов

животных, в том числе и человека [4–9]. Защита организма от LM осуществляется двумя системами иммунитета врожденного и приобретенного. Для изучения механизмов защитного иммунного ответа на LM, необходимо, прежде всего, определять вирулентность этой

поступила в редакцию 10.11.2011
отправлена на доработку 21.11.2011
принята к печати 21.03.2012

© Антошина И.Ф.,
Мезенцева М.В., 2012

Адрес для переписки:

Мезенцева Марина Владимировна,
д.б.н., старший научный сотрудник
лаборатории культур тканей
ФГБУ НИИ вирусологии
им. Д.И. Ивановского МЗиСР РФ

123098, Москва, ул. Гамалеи, 16.
Тел./факс: (499) 190-28-50.
E-mail: marmez@mail.ru

бактерии [7]. Инфекционный агент преодолевает три принципиальных защитных барьера на пути распространения в организме: LM проникает сквозь клетки стенки кишечника, заражая их, затем попадает в кровь и лимфу, и далее, преодолевая гематоэнцефалический барьер, в мозг и/или в плаценту через плацентарный барьер [9]. LM — классический внутриклеточный паразит, способный проникать внутрь клетки путем фагоцитоза. В период заболевания, LM может поражать разнообразные ткани и типы клеток.

Listeria monocytogenes является одной из самых изученных внутриклеточных бактерий. Особенно много внимания было уделено изучению механизмов начального проникновения LM в клетку и распространения бактерий от зараженных клеток к здоровым. Вначале LM включает систему фагоцитоза в разных типах клеток хозяина, в том числе и в тех клетках, для которых фагоцитоз обычно не свойственен. Для этого LM использует специальный набор бактериальных белков, модулирующих мембрану клетки хозяина. Идентифицировано 2 бактериальных белка, участвующих в этом процессе: internalin A (InlA) и B (InlB). Далее LM проникает сквозь фагосому в цитоплазму клетки хозяина при помощи порообразующего токсина листериолизина O (LLO). Оказавшись в цитоплазме клетки, LM быстро делится, передвигаясь внутри клетки при помощи бактериального поверхностного белка ActA, модулирующего полимеризацию актина вокруг бактерии [3, 9].

Листериоз является одной из старейших экспериментальных инфекций, а LM представляет собой классический объект для изучения механизмов клеточного иммунитета [9]. Изучение на протяжении 35 лет воздействия LM *in vivo* на мышей привело к пониманию комплексности взаимодействия различных клеток и медиаторов врожденного антибактериального иммунитета [5–12]. При использовании этой модели, было показано ключевое значение нейтрофилов и естественных киллеров (NK) для инициации защитных механизмов на начальных стадиях заболевания. Нейтрофилы особенно важны для уничтожения LM, поражающих клетки печени (гепатоциты и клетки Купфера). Макрофаги и NK активируются и оказывают взаимостимулирующее влияние благодаря секреции интерлейкина-12 (IL-12) и фактора некроза опухоли- α (TNF α). Комбинация этих двух цитокинов стимулирует NK продуцировать интерферон- γ (IFN γ), который, в свою очередь, является одним из важнейших активаторов макрофагов. Роль

макрофагов в иммунном ответе на инфекцию, вызванную LM, двойка: во-первых, они участвуют в презентации LM-антигенов иммунокомпетентным клеткам, во-вторых, макрофаги модулируют Th1-тип иммунного ответа. Доказано, что CD4⁺ и CD8⁺ лимфоциты ответственны за окончательное уничтожение LM в зараженном организме [1, 14, 40].

Интересно отметить, что не все макрофаги обладают способностью уничтожать внутриклеточных паразитов, в частности бактерию LM. Возможно, антилистериальная активность зависит от стадии дифференцировки данного макрофага или от микроокружения данной клетки. Так, в ходе многочисленных исследований было установлено, что слишком высокая или низкая внутриклеточная концентрация ионов железа снижает антибактериальную активность макрофагов; при этом внутриклеточный путь LM предопределяется типом рецептора, использованного макрофагом при фагоцитировании бактерии; а макрофаги, на мембране которых представлен IL-10, известный дезактиватор макрофагов, не могут уничтожить LM [13]. Макрофаги, так же как и другие клетки млекопитающих, реагируют на заражение LM включением различных систем вторичных посредников. Это влияет, прямо или опосредованно, на экспрессию различных генов клетки-хозяина, в том числе генов стресса, генов, ассоциированных с главным комплексом гистосовместимости I (MHC I) и MHC II локусами, генов различных цитокинов и их рецепторов [33].

Интересно, что LM, как и многие другие паразитарные микроорганизмы, модулирует экспрессию генов клеток хозяина, влияющих на внутриклеточную репликацию бактерий [28]. Так, кратковременная или постоянная активация системы вторичных посредников была отмечена во всех экспериментах по заражению LM разных типов клеток млекопитающих. При этом тип задействованных вторичных посредников зависел, в том числе, и от локализации LM внутри клетки. Оказавшись в цитозоле инфицированной клетки, LM секретирует ряд вирулентных белков [28]. Эти белки подвергаются деградации в протеосомах клетки хозяина и дальнейшему процессингу, характерному для презентации антигенов. Получившиеся короткие пептиды преимущественно представляются в ассоциации с молекулами MHC I [23]. Антигены, включенные в комплекс с MHC I, являются прекрасной мишенью для цитотоксических T-лимфоцитов (CD8⁺). Эффективность этого процесса зависит от типа исследуемого антигена. В целом,

для белков, экспрессируемых LM, эффективность презентации достаточно высока: от 3 до 30% наномерных пептидов, полученных из белков LM, входят в комплекс с МНС I [19]. Также велика эффективность образования LM-специфических эпитопов в ассоциации с МНС I на поверхности CD8⁺ лимфоцитов. Таким образом, белки LM высокоиммуногенны. Для этого процесса характерна выраженная презентация антигенов (разнообразие представленных эпитопов и высокая концентрация антиген-МНС I комплексов на поверхности клеток) и реактивность Т-киллеров.

Цитотоксические лимфоциты, опознавшие антиген в комплексе с МНС I на поверхности зараженной клетки, активируются и, прямо или опосредованно, уничтожают агрессора [35]. CD4⁺ лимфоциты (Т-хелперы, Th) выполняют вспомогательную функцию при защите от листериоза. Иммунный ответ на LM сдвинут в сторону реакции по типу Th1; реакция по типу Th2 считается нехарактерной для листериоза. IL-4 — классический цитокин, продуцируемый при Th2-типе иммунного ответа, определяется только на ранних стадиях развития заболевания [1, 24]. Ранняя экспрессия IL-4 во время иммунного ответа на LM происходит на лимфоцитах, несущих на своей поверхности CD4, NK1 и Т-клеточный рецептор $\alpha\beta$ (ab-TCRab). Эти лимфоциты с данными маркерами относятся к группе НК лимфоцитов или к группе нетипичных Т-клеток. IL-4 стимулирует экспрессию и секрецию различных хемокинов и цитокинов, модулируя, таким образом, характер иммунного ответа на LM. Исчезновение IL-4 и переключение типа иммунного ответа обуславливается, в частности, появлением и действием IL-12, раннего цитокина, стимулирующего Th1-тип иммунного ответа [10]. Также было показано, что В-клетки и антитела играют меньшую, но все же существенную роль, в течении *L. monocytogenes*-инфекции [11, 27, 37].

В период развития заболевания бактерия LM может вызывать каскад гистологических изменений в тканях, который, в ряде случаев, приводит к появлению гранулем. Многочисленные исследования, проведенные в основном на моделях мышинного листериоза, показали, что неспецифически-активированные CD4⁺ лимфоциты предопределяют сценарий перехода от образования неспецифических микроабсцессов к формированию воспалительных гранулем [22]. Этот процесс происходит при накоплении локально высоких концентраций TNF α и IFN γ , а также при наличии локальной или системной экспрессии IL-2. Такая комбинация цитокинов индуцирует CD11b

независимое накопление моноцитов (недифференцированных макрофагов) в интрапаренхимном пространстве. Аккумуляция активированных и LM-пораженных моноцитов в интрапаренхиме приводит к формированию гранулем. Локальное или системное снижение концентраций TNF α и IFN γ приводит к катастрофическому усилению листериоза и потому не может быть использовано в клинической практике [17]. В настоящее время ведется активный поиск и изучение механизмов, направленно блокирующих TNF α - и IFN γ -зависимую миграцию моноцитов.

Недавно было обнаружено, как вирулентная бактерия *L. monocytogenes* побуждает зараженные иммунные клетки уклоняться от собственного защитного ответа [32]. Исследования показали взаимодействие между паразитом и хозяином и предполагали потенциальные терапевтические мишени при пищевом отравлении, туберкулезе, аутоиммунных болезнях. L. Lenz обнаружил, что макрофаги, зараженные бактериями *Listeria*, секретируют IFN α/β , который делает макрофаги и другие иммунные клетки невосприимчивыми к сигналам активации. Это снижает иммунную устойчивость к бактерии, которая вызывает ежегодно тысячи случаев пищевого отравления, а в США, например, больше 500 смертельных случаев каждый год.

Предполагается, что *Listeria* увеличивает свое выживание в организме, вызывая перекрестную связь между сигнальными путями IFN. Когда клетки иммунной системы встречаются с непатогенными микробами, они обычно захватывают и разрушают их. Однако, определенные болезнетворные микроорганизмы, такие как *Listeria* могут расти в иммунных клетках, которые затем подают сигналы в другие соседние клетки. Одними из этих сигналов являются интерфероны I типа IFN α/β , которые защищают клетки хозяина от вирусной инфекции. Однако, IFN α/β также увеличивают рост *Listeria* и некоторых других бактерий. Показано [32], что IFN α/β снижают уровень экспрессии рецепторов IFN γ . А при низком уровне экспрессии рецепторов IFN γ покоящиеся макрофаги, которые особенно эффективны против внутриклеточных болезнетворных микроорганизмов, не могут быть в активном состоянии. Это исследование выдвигает на первый план перекрестную связь, которая существует между антибактериальной и противовирусной защитой иммунной клетки. То есть получены доказательства, что IFN α/β — известные стимуляторы противовирусной защиты, одновременно подавляют антибактериальную деятельность.

Возможно, этот путь иммунной системы необходим для более эффективной защиты против вирусных патогенов, чтобы избежать негативного действия сверхактивации иммунных клеток. Лечение $IFN\beta$ широко используется сейчас при рассеянном склерозе, действуя, в частности, за счет низкой экспрессии рецепторов $IFN\gamma$ на миелоидных клетках, уменьшая, таким образом, стимулирование аутоиммунных Т-клеток. Следующим вопросом в исследованиях является объяснение, как $IFN\alpha/\beta$ добиваются низкого уровня регулирования рецепторов $IFN\gamma$ и определение, способствует ли предотвращение этих эффектов сопротивлению к инфекции вызванной *Listeria* и другими бактериальными болезнетворными микроорганизмами [32].

Европейскими учеными были проведены исследования модулирования макрофагального цитокинового ответа через STAT-серинфосфорилирование и индукцию подавления сигнализации цитокинов [38]. Активация макрофагов является частью естественной резистентности к инфекции, вызванной стимулированием $IFN\gamma$ в ответ на вторжение микроорганизмов и микробных продуктов. Инфицирование макрофагов Грам+ бактерией *Listeria monocytogenes* индуцировало фосфорилирование транскрипционных факторов STAT1 на S727, и тем самым экспрессию $IFN\gamma$ индуцированных генов. В отличие от устойчивого инфицирования жизнеспособными бактериями, обработка *Listeria*, инактивированных нагреванием, уменьшила $IFN\gamma$ стимулированную транскрипцию и фосфорилирование STAT1 на S727. Снижение $IFN\gamma$ сигнализации коррелирует с индукцией mPDK и белка супрессорной сигнализации цитокинов 3 (SOCS3). Для максимального синтеза SOCS3 требуются непосредственные сигналы от рецепторов *Listeria* на поверхности клеток, а также активирование секреции полипептида в ответ на бактериальную инфекцию. Индукция SOCS3 секретлируемых белков не может быть заблокирована нейтрализацией Abs IL-10 и не требует присутствия STAT1. В соответствии с индукцией активности SOCS3, *Listeria* также препятствует активации STAT5 на GM-CSF. P38 митоген-активированная протеинкиназа способна быстро реагировать при инфекции макрофагов *Listeria monocytogenes*. Торможение p38 митоген-активированной протеинкиназы тормозит в свою очередь как STAT1 S727 фосфорилирование, так и экспрессию SOCS3. Эти данные позволяют предположить, что активность STAT1 серинкиназы и SOCS3 — это признаки немедленных

и отсроченных этапов влияния бактериальных сигналов на сигнал трансдукции в $IFN\gamma$ ответе.

Были проведены интересные исследования воздействия *Chlorella vulgaris* (CVE) — одноклеточных зеленых морских водорослей — на синтез $IFN\gamma$, IL-2, IL-4 и IL-10 у нормальных мышей и мышей, зараженных *Listeria monocytogenes* [31]. Результаты продемонстрировали, что у незараженных мышей введение CVE не оказывало влияния на уровни экспрессии изучаемых цитокинов. Однако инфекция *Listeria monocytogenes* увеличивала продукцию $IFN\gamma$ и IL-2 через 48 и 72 часа после инфицирования. Интересно, что обработка пятью последовательными дозами по 50 мг/кг в день CVE предварительно перед инфекцией привело к дальнейшему увеличению уровней $IFN\gamma$ и IL-2 через 48 и 72 часа после инфицирования. При этом изменений в продукции IL-4 и IL-10 не наблюдалось у мышей, инфицированных *Listeria monocytogenes* и CVE. Эти результаты в соответствии с другими литературными данными показывают, что CVE — биологический модификатор иммунного ответа, который увеличивает сопротивление к *Listeria monocytogenes*, возможно, благодаря повышению выработки IL-2 и $IFN\gamma$.

Недавно опубликованные данные французских ученых изучения влияния тетраспанина CD81 на инвазию *Listeria monocytogenes* [39] показывают, что внутриклеточный бактериальный болезнетворный микроорганизм *Listeria monocytogenes* вторгается в эпителиальные клетки, взаимодействуя с двумя клеточными рецепторами e-cadherin и met. *Listeria monocytogenes* способна вызвать свою интернализацию в нефагоцитарные эпителиальные клетки, взаимодействуя с e-cadherin (лиганд бактериально-поверхностного белка internalin) и фактором роста гепатоцита met (лиганд InlB) [29]. Была установлена роль II phosphatidylinositol 4-kinases α и β (PI4KII α и PI4KII β) во время входа *Listeria* [30]. В этих работах приведены исследования тетраспанинов CD9, CD63, CD81, которые в литературе фигурируют как молекулярные партнеры PI4KII α и функционируют как молекулярные адаптеры, рекрутирующие PI4KII α к месту внедрения бактерий. Показано, что CD9, CD63 и CD81 экспрессировались и определялись на поверхности клетки а также в пределах внутриклеточного пространства, особенно в случае CD63. В покоящихся клетках совместная локализация тетраспанинов и PI4KII α обнаруживалась только в ограниченных местах перинуклеарной области. При листериозной инфекции к месту входа бактерий были рекрутированы CD9, CD63, CD81,

которые не локализовывались строго вместе с эндогенным PI4KII α рецептором. Появление жизнеспособных клеток подтверждает, что тетраспанины и PI4KII α не следуют одинаковыми путями миграции к месту входа *Listeria*. Снижение CD9, CD63 и CD81 уровней siРНК демонстрировало, что CD81 требуется для бактериальной интернализации. Кроме того, снижение уровня CD81 ингибирует вовлечение PI4KII α к месту внедрения бактерии, а CD81 может действовать как мембранный организатор, требуемый для целостности сигнальных путей процессов, происходящих на местах входа *Listeria*. Однако на данном этапе не известно, какие сигнальные каскады активизирует PI4KII α во время проникновения *Listeria*, и как эти липидные киназы рекрутируют к месту входа бактерий после активации met.

Рядом ученых была исследована экспрессия генов цитокинов у мышей в течение 24 часов после инфекции, вызванной различными штаммами *Listeria spp.*, отличающихся, как было определено *in vivo*, вирулентностью, активностью роста и дозой заражения (LD₅₀). Все вирулентные штаммы *L. monocytogenes* вызывали экспрессию мРНК IL-1 α , IFN γ , IFN α в селезенках мышей, в то время как штамм *L. monocytogenes*, не способный к производству листериолизина O, и штамм *Listeria innocua* вызывали экспрессию только мРНК IFN γ . Уровни экспрессии генов IL-1 α и IFN γ были пропорциональны уровням листериолизина O, продуцируемым каждым штаммом. Те штаммы, которые вызывали экспрессию гена IFN γ , были способны создавать защитный иммунитет в зараженном организме животных. Можно предположить, что связанная с вирулентностью индукция некоторых цитокинов на начальной стадии инфекции играет определенную роль в развитии приобретенного кле-

точного иммунитета при листериозе [41]. Как было показано ранее, IL-1 α , IFN γ и TNF α , но не IL-6, на ранней стадии инфекции участвуют в неспецифической резистенции мышей к вирулентному штамму *L. monocytogenes* [4, 14–16].

Нами проведена серия экспериментов, в которых были изучены изменения показателей иммунного ответа на разных этапах развития инфекции (в течение 3–5 суток), вызванной *L. monocytogenes*, в зависимости от количества и свойств заражающих бактерий (табл.). Мыши линии Balb/c были внутривенно инфицированы листериями штамма EGDe (wt) и бактериями изогенных штаммов, с мутациями в генах, контролирующих продукцию PAMPs (d28, i28). В первой серии экспериментов при заражении мышей *L. monocytogenes* в дозе 0,1 LD₅₀ бактерии накапливались в печени мышей в небольших количествах, инфекция протекала в легкой форме и животные выздоравливали уже через 3 суток наблюдения. В следующих сериях экспериментов исследовались закономерности изменения экспрессии генов цитокинов при средневысокой степени инфицированности животных (1,0 LD₅₀), а также при летальной дозе патогена (10 LD₅₀), когда животные погибали на 2 сутки после инфицирования.

Экспрессия генов 10 цитокинов (IFN α , IFN γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, TNF α) оценивалась в спленоцитах, выделенных из селезенки мышей, по активности их мРНК, определяемых методами обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) и ОТ-ПЦР в реальном времени. Спленоциты выделяли в эксперименте через 6 часов, а затем каждый день в течение 3–7 суток после заражения животных *L. monocytogenes*. В те же сроки производили высевы на чашки Петри для подсчета накопления бактерий в пе-

ТАБЛИЦА. ИЗМЕНЕНИЯ ИММУНИТЕТА У МЫШЕЙ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ *L. MONOCYTOGENES IN VIVO*

Штаммы <i>Listeria monocytogenes</i>	Низкая степень заражения	Средневысокая степень заражения	Летальная доза
EGDe (wt)	↑↓ Th2 (↑IL-6, ↑↓IL-4) ↓ В-лимфоциты, моноциты/ макрофаги Норма — Th1, IL-10	↑↓ Th2 (↑IL-6, ↑↓IL-4, ↓IL-10) ↓Th1, В-лимфоциты, моноциты/макрофаги	↑ Th2 (IL-4, IL-6) ↓Th1, В-лимфоциты, моноциты/макрофаги Норма — IL-10
d28 — штамм с мутациями в гене lmo0028	↑↓ Th2 (↑IL-6, ↑↓IL-4, ↓IL-10) ↓Th1, моноциты/макрофаги Норма — IFN α , IL-12, TNF β	↑↓ Th2 (↑IL-6, ↑↓IL-4, ↓IL-10) ↓Th1, В-лимфоциты, моноциты/макрофаги	↑ Th2 (IL-4, IL-6) ↓Th1, моноциты/макрофаги Норма — IFN α , IL-10, TNF β
i28 — штамм с мутациями в гене lmo0028	н/и	н/и	↑ Th2 (IL-4, IL-6) ↓ В-лимфоциты, моноциты/ макрофаги Норма — IL-10, Th1

Примечание: ↑ — активация клеток/экспрессии генов цитокинов; ↓ — подавление функций клеток/экспрессии генов цитокинов; Норма — на уровне здоровых животных; н/и — не исследовалось.

чени мышей. Результаты, полученные в ходе проведенных экспериментов, позволили сделать следующие выводы.

1) Показано, что при экспериментальном листериозе, независимо от степени заражения и штамма *L. monocytogenes*, синтез IL-10 на уровне экспрессии гена был либо подавлен, либо находился на уровне здоровых животных. А так как известно, что избыток IL-10 приводит к снижению противоинфекционной защиты и развитию хронических инфекций, полученные данные подтверждают тот факт, что хроническая инфекция, вызванная исследованными патогенами, не развивается.

2) Отмечено, что при листериозе при низкой степени инфицированности у мышей на 2–3 сутки наблюдения наряду с экспрессией генов IL-6 и IL-10 отмечалась транскрипция IL-4 — цитокинов, вырабатываемых Th2 и обуславливающих гуморальный тип иммунного ответа. По-видимому, и выработка антител происходила у этих животных на 3 день после заражения. При средневысокой и летальной дозах заражения у мышей уже через 6 часов после инфицирования был обнаружен активный синтез мРНК IL-4 и IL-6. Что может свидетельствовать о том, что антитела к данной инфекции начинали вырабатываться у мышей через 6 часов после развития заболевания.

3) Установлены дозозависимые различия в профиле синтеза мРНК цитокинов в первые трое суток после инфекции, вызванной *L. monocytogenes* дикого типа (wt). Так, при низких дозах заражения, происходило частичное подавление синтеза мРНК цитокинов, вырабатываемых Th2, а активность мРНК цитокинов, относящихся к Th1-типу, не изменялась. При средних дозах заражения, также происходило частичное подавление синтеза мРНК цитокинов, вырабатываемых Th2, и подавление цитокинов, характеризующих развитие Th1-тип иммунного ответа. При высокой дозе заражения на фоне подавления экспрессии генов цитокинов, характерных для Th1-типа иммунного ответа, наблюдалась активация синтеза цитокинов, характеризующих развитие иммунного ответа по Th2 пути.

Нами показано, что в первые сутки развития инфекции у мышей, зараженных разными штаммами *L. monocytogenes* с мутациями в гене *lmo0028*, кодирующем белок метаболизма пептидогликана L,D-карбоксипептидазу, при низкой степени инфицированности было отмечено нарушение функций Th1 звена иммунитета. А при средневысокой и высокой степени инфицированности, было обнаружено нарушение функций практически всех им-

мунокомпетентных клеток организма, так как в экспериментах регистрировалось снижение экспрессии генов цитокинов, вырабатываемых Th1, В-лимфоцитами и моноцитами/макрофагами, и дисбаланс в синтезе цитокинов, продуцируемых Th2.

Таким образом, можно предполагать, что на начальных этапах инфекции листерии способны подавлять основной для элиминации внутриклеточных паразитов Th1-тип иммунного ответа. Полученные нами данные важны для понимания степени нарушений иммунитета при инфекции, вызванной *L. monocytogenes*, и в дальнейшем для разработки подходов к терапии листериоза.

Анализ литературных данных и полученных нами результатов позволяет заключить, что иммунный ответ при листериозе играет важную роль и зависит как от штамма возбудителя, так и от дозы бактерии и различных других условий заражения. Проведенные исследования могут быть полезны при выборе тактики лечения заболевания, вызванного *Listeria monocytogenes*, и, возможно, других заболеваний, вызываемых внутриклеточными бактериями.

Список литературы

1. Воробьев А.А., Середя А.Д., Бакулов И.А., Котляров В.М. Иммунитет при листериозе // ЖМЭИ. — 2000. — № 5. — С. 98–102.
2. Зайцева Е.А., Ермолаева С.А., Сомов Г.П. Гены, кодирующие факторы инвазии у штаммов *Listeria monocytogenes*, изолированных в Европейской части и Дальневосточном регионе России // ЖМЭИ. — 2006. — № 4. — С. 42–45.
3. Тартаковский И.С., Малеев В.В., Ермолаева С.А. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика. — М.: Медицина для всех, 2002. — 200 с.
4. Beutler B., Tkagenko V., Milsark I., Krochin M., Cerami A. Effect of γ interferon on cachectin expression by mononuclear phagocytes, reversal of the *Ipsd* (endotoxin resistance) phenotype // *J. Exp. Med.* — 1986. — Vol. 164. — P. 1791–1796.
5. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria // *Science*. — 2004. — Vol. 303. — P. 1532–1535.
6. Brzoza K.L., Rockel A.B., Hiltbold E.M. Cytoplasmic entry of *Listeria monocytogenes* enhances dendritic cell maturation and T cell differentiation and function // *J. Immunol.* — 2004. — Vol. 173. — P. 2641–2651.
7. Carrero J.A., Calderon B., Unanue E.R. Lymphocytes are detrimental during the early innate immune response against *Listeria monocytogenes* // *J. Exp. Med.* — 2006. — Vol. 203. — P. 933–940.

8. Conlan J.W. Early pathogenesis of *Listeria monocytogenes* infection in the mouse spleen // *J. Med. Microbiol.* — 1996. — Vol. 44. — P. 295–302.
9. Czuprynski C.J., Brown J.F., Wagner R.D., Steinberg H. Administration of antigranulocyte monoclonal antibody RB6-8C5 prevents expression of acquired resistance to *Listeria monocytogenes* infection in previously immunized mice // *Infect. Immun.* — 1994. — Vol. 62. — P. 5161–5163.
10. Daugelat S., Ladel C.H., Schoel B., Kaufmann S.H. Antigen-specific Tcell responses during primary and secondary *Listeria monocytogenes* infection // *Infect. Immun.* — 1994. — Vol. 62. — P. 1881–1888.
11. Edelson B.T., Unanue E.R. Intracellular antibody neutralizes *Listeria* growth // *Immunity.* — 2001. — Vol. 14. — P. 503–512.
12. Guleria I., Pollard J.W. Aberrant macrophage and neutrophil population dynamics and impaired Th1 response to *Listeria monocytogenes* in colony-stimulating factor 1-deficient mice // *Infect. Immun.* — 2001. — Vol. 69. — P. 1795–1807.
13. Harty J.T., Bevan M.J. Specific immunity to *Listeria monocytogenes* in the absence of IFN gamma // *Immunity.* — 1995. — Vol. 3. — P. 109–117.
14. Havel E.A., Moldawer L.L., Helfgott D., Kilian P.L., Shegal P.B. Type-1 IL-1 receptor blockade exacerbates murine listeriosis // *J. Immunol.* — 1992. — Vol. 148. — P. 1486–1490.
15. Hiromatsu K., Yoshikai Y., Matsuzaki G., Ohga S., Muramori K., Matsumoto K., Bluestone J.A., Nomoto K. A protective role of gamma/delta T cells in primary infection with *Listeria monocytogenes* in mice // *J. Exp. Med.* — 1992. — Vol. 175. — P. 49–56.
16. Igarashi K.I., Mitsuyama M., Muramori K., Tsukada H., Nomoto K. Interleukin-1-induced promotion of T-cell differentiation in mice immunized with killed *Listeria monocytogenes* // *Infect. Immun.* — 1990. — Vol. 58. — P. 3973–3979.
17. Jung S., Unutmaz D., Wong P., Sano G., De los Santos K., Sparwasser T., Wu S., Vuthoori S., Ko K., Zavala F., Pamer E.G., Littman D.R., Lang R.A. In vivo depletion of CD11 dendritic cells abrogates priming of CD8 T cells by exogenous cell-associated antigens // *Immunity.* — 2002. — Vol. 17. — P. 211–220.
18. Koerner T.J., Adams D.O., Hamilton T.A. Regulation of tumor necrosis factor (TNF) expression: interferon- γ enhances the accumulation of inRNA for TNF induced by lipopolysaccharide in murine peritoneal macrophages // *Cell. Immunol.* — 1987. — Vol. 109. — P. 437–443.
19. Kuhn M., Goebel W. Induction of cytokines in phagocytic mammalian cells infected with virulent and avirulent *Listena* strains // *Infect. Immun.* — 1994. — Vol. 62. — P. 348–356.
20. Kurtz R.S., Young K.M., Czuprynski C.J. Separate and combined effects of recombinant interleukin-1 α and gamma interferon on antibacterial resistance // *Infect. Immun.* — 1989. — Vol. 57. — P. 553–558.
21. Mackaness G.B. Cellular resistance to infection // *J. Exp. Med.* — 1962. — Vol. 116. — P. 381–406.
22. Mandel T.E., Cheers C. Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection: histopathology of listeriosis in resistant and susceptible strains // *Infect. Immun.* — 1980. — Vol. 30. — P. 851–861.
23. McCaffrey R.L., Fawcett P., O’Riordan M., Lee K.D., Havel E.A., Brown P.O., Portnoy D.A. A specific gene expression program triggered by Gram-positive bacteria in the cytosol // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2004. — Vol. 101. — P. 11386–11391.
24. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity // *Nat. Rev. Immunol.* — 2001. — Vol. 1. — P. 135–145.
25. Mitsuyama M., Igarashi K., Kawamura I., Ohmori T., Nomoto K. Difference in the induction of macrophage interleukin-1 production between viable and killed cells of *Listeria monocytogenes* // *Infect. Immun.* — 1990. — Vol. 58. — P. 1254–1260.
26. Nakane A., Numata A., Minagawa T. Endogenous tumor necrosis factor, interleukin-6, and gamma interferon levels during *Listeria monocytogenes* infection in mice // *Infect. Immun.* — 1992. — Vol. 60. — P. 523–528.
27. Ochsenbein A.F., Fehr T., Lutz C., Suter M., Brombacher F., Hengartner H., Zinkernagel R.M. Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies // *Science.* — 1999. — Vol. 286. — P. 2156–2159.
28. O’Riordan M., Yi C.H., Gonzales R., Lee K.D., Portnoy D.A. Innate recognition of bacteria by a macrophage cytosolic surveillance pathway // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2002. — Vol. 99. — P. 13861–13866.
29. Pizarro-Cerda J., Cossart P. Bacterial adhesion and entry into host cells // *Cell.* — 2006. — Vol. 124. — P. 715–727.
30. Pizarro-Cerda J., Payrastre B., Wang Y.J., Veiga E., Yin H.L., Cossart P. Type II phosphatidylinositol 4-kinases promote *Listeria monocytogenes* entry into target cells // *Cell. Microbiol.* — 2007. — Vol. 9. — P. 2381–2390.
31. Queiroz M.L., Bincoletto C., Valadares M.C., Dantas D.C., Santos L.M. Effects of *Chlorella vulgaris* extract on cytokines production in *Listeria monocytogenes* infection // *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* — 2002. — Vol. 24. — P. 483–496.
32. Rayamajhi M., Humann J., Penheiter K., Andreasen K., Lenz L.L. Induction of IFN $\alpha\beta$ enables *Listeria monocytogenes* to suppress macrophage activation by IFN γ // *J. Exp. Med.* Vol. — Vol. 207, N 2. — P. 327–337.
33. Rogers H.W., Unanue E.R. Neutrophils are involved in acute, nonspecific resistance to *Listeria monocytogenes* in mice // *Infect. Immun.* — 1993. — Vol. 61. — P. 5090–5096.
34. Roll J.T., Young K.M., Kurtz R.S., Czuprynski C.J. Human rTNF α augments anti-bacterial resistance in mice: potentiation of its effects by recombinant human IL-1 α // *Immunology.* — 1990. — Vol. 69. — P. 316–322.
35. Segal A.W. How neutrophils kill microbes // *Annu. Rev. Immunol.* — 2005. — Vol. 23. — P. 197–223.

36. Serbina N.V., Kuziel W., Flavell R., Akira S., Rollins B., Pamer E.G. Sequential MyD88-independent and -dependent activation of innate immune responses to intracellular bacterial infection // *Immunity*. — 2003. — Vol. 19, N 6. — P. 891–901.
37. Shen H., Whitmire J.K., Fan X., Shedlock D.J., Kaech S.M., Ahmed R. A specific role for B cells in the generation of CD8 T cell memory by recombinant *Listeria monocytogenes* // *J. Immunol.* — 2003. — Vol. 170. — P. 1443–1451.
38. Stoiber D., Stockinger S., Steinlein P., Kovarik J., Decker T. *Listeria monocytogenes* Modulates Macrophage Cytokine Responses Through STAT Serine Phosphorylation and the Induction of Suppressor of Cytokine Signaling // *J. Immunology*. — 2001. — Vol. 166, N 1. — P. 466–472.
39. Tham T.N., Gouin E., Rubinstein E., Boucheix C., Cossart P., Pizarro-Cerda J. Tetraspanin CD81 is required for *Listeria monocytogenes* invasion // *Infect. Immun.* — 2010. — Vol. 78, N 1. — P. 204–209.
40. Tripp C.S., Wolf S.F., Unanue E.R. Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1993. — Vol. 90. — P. 3725–3729.
41. Xiong H., Kawaura I., Nishibori T., Matsuyama M. Cytokine gene expression in mice at an early stage of infection with various strains of *Listeria* spp. differing in virulence // *Infect. Immun.* — 1994. — Vol. 62, N 9. — P. 3649–3654.
42. Zenewicz L.A., Shen H. Innate and adaptive immune responses to *Listeria monocytogenes*: a short overview // *Microbes Infect.* — 2007. — Vol. 9. — P. 1208–1215.