

УДК 616-002.71-085.324:593.96

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ АПОПТОЗМОДУЛИРУЮЩЕГО ВЛИЯНИЯ ТЕРМОСТАБИЛЬНОГО ТОКСИНА *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* И КОРРИГИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ЭКСТРАКТА ИЗ ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫХ ВИДОВ ГОЛОТУРИЙ НА НЕЙТРОФИЛЫ КРЫС *IN VITRO*

Л.С. Долматова¹, О.А. Заика¹, Е. П. Недашковская², Н.Ф.Тимченко²

¹ Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева ДВО РАН (690041 г. Владивосток, ул. Балтийская, 43),

² НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (690087 г. Владивосток, ул. Сельская,1)

Ключевые слова: *Yersinia pseudotuberculosis*, бактериальные токсины, экстракт из голотурий, нейтрофилы.

Показано, что термостабильный летальный токсин *Y. pseudotuberculosis* оказывал концентрационно-зависимое действие на активность антиоксидантных ферментов, апоптоз и жизнеспособность нейтрофилов, а также на уровень связывания поверхностных рецепторов клеток с конканавалином А *in vitro*. Эффект токсина также зависел и от времени инкубирования. Результаты экспериментов по совместному введению с токсином ингибитора фосфодиэстеразы (кофеина) и коммерческой каталазы свидетельствуют о том, что эффекты токсина зависят от уровня циклического аденозинмонофосфата в клетках, а развитие апоптоза происходит на фоне повышения активности антиоксидантных ферментов. Использование экстракта из дальневосточных видов голотурий предотвращало ингибирующее действие токсина на связывание рецепторов клеток с конкавалином А, модулировало апоптоз и активность антиоксидантных ферментов, повышая функциональную активность нейтрофилов.

Псевдотуберкулез, или дальневосточная скарлатиноподобная лихорадка, вызываемый *Yersinia pseudotuberculosis*, широко распространен на Дальнем Востоке России и в Сибири. Заболевание сопровождается значительным снижением иммунной защиты организма [3]. Важную роль в иммунопатогенезе псевдотуберкулеза играет термостабильный токсин *Y. pseudotuberculosis* (ТсТүр) – белок с молекулярной массой 45 кДа [4]. Отмечено, что он снижает фагоцитарную активность нейтрофилов и мононуклеарных лейкоцитов периферической крови человека. Однако механизмы этого влияния исследованы недостаточно. Вместе с тем понимание данных механизмов важно, в частности, для разработки препаратов, позволяющих предотвратить токсическое действие бактерий псевдотуберкулеза на функциональную активность лейкоцитов человека и животных.

Из тканей ряда голотурий, обитающих в шельфовой зоне морей Дальнего Востока, был экстрагирован комплекс биологически активных веществ, эффективно ингибирующий рост грибов и бактерий, в том числе *Y. pseudotuberculosis*, *in vitro* [2]. Производство экстракта регламентируется ТУ 9154-001-77418193-07. Экстракт из голотурий имеет высокую антиоксидантную активность, по-видимому, обусловленную входящими в его состав каротиноидами и фосфолипидами. Однако его иммуномодулирующее действие при воздействии ТсТүр оставалось неисследованным.

Целью данной работы явился анализ механизмов влияния ТсТүр на нейтрофилы периферической крови крыс *in vitro* и возможного защитного эффекта экстракта из голотурий.

Материал и методы. Десять самок крыс Wistar депонированы под эфирным наркозом в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (утверждены МЗ СССР в 1977 г., приказ № 755). Нейтрофилы периферической крови получали центрифугированием в градиенте фиколла-верографина. ТсТүр был выделен из штамма 512 1-го серовара *Y. pseudotuberculosis*, изолированного от больного псевдотуберкулезом. Экстракт из голотурий получали по методу, описанному Л.С. Долматовой и др. [2].

Инкубацию клеток проводили при 37 °С в круглодонных планшетах (1×10⁶ кл./мл) в атмосфере 5 % CO₂. В лунки добавляли забуференный (рН 7,4) физиологический раствор (контроль) или ТсТүр (0,2 и 0,5 мкг/мл). Концентрации токсина, оказывающие различное модулирующее действие на уровень оксидантной активности в нейтрофилах крови человека, были выбраны в ранее проведенных экспериментах [4]. Для выяснения роли антиоксидантных ферментов и циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) в механизмах действия ТсТүр в отдельные лунки одновременно с последним добавляли коммерческий препарат каталазы, полученной из печени крупного рогатого скота (0,7 мкг/мл), или кофеин (10⁻⁶ М) – ингибитор цАМФ-фосфодиэстеразы [13]. В ряд лунок вместе с токсином добавляли экстракт из голотурий в физиологическом растворе (1 и 10 мкг/мл). Эффекты добавленных одновременно с ТсТүр препаратов оценивали в сравнении с действием одного токсина. Отбор проб проводили через 24 и 48 часов.

Жизнеспособность клеток в полученных фракциях определяли с использованием трипанового синего. Апоптоз выявляли по морфологическим изменениям ядер, используя краситель Нoeschst 33342 [7].

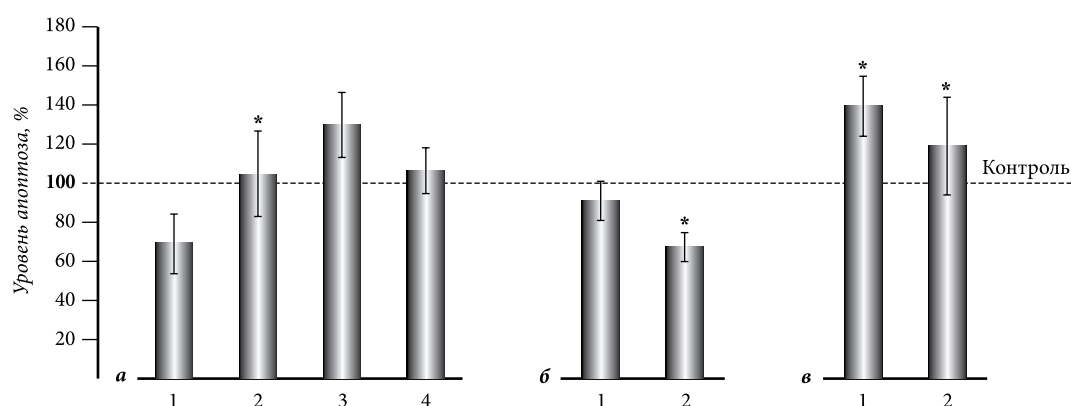
Перед измерением активности антиоксидантных ферментов клетки разрушали ультразвуком (УЗДН-1, 22 кГц) 25×6 с (0 °С). Ядра осаждали центрифугированием. В полученных супернатантах спектрофотометрическими методами измеряли активность глутатионредуктазы (ГР) и каталазы [1]. Концентрацию белка определяли окраской Кумасси бриллиантовым голубым G-250. Определение уровня связывания

Таблица

Влияние ТсТҮр на показатели клеточного ответа нейтрофилов периферической крови крыс

Тип воздействия	Уровень апоптоза, % (48 часов)	Активность каталазы, мкмоль/мин на 1 мг белка		Активность ГР, нмоль/мин на 1 мг белка (24 часа)	Уровень связывания кон А, %	
		24 часа	48 часов		24 часа	48 часов
Контроль	59,6±4,2	520±40	2200±110	1,18±0,10	33,3±2,9	47,8±5,9
ТсТҮр, 0,2 мкг/мл	41,0±5,1*	560±18*	1200±52*	1,83±0,16	25,0±3,6	67,4±6,5*
ТсТҮр, 0,5 мкг/мл	76,9±10,2	1700±220*	1680±91*	6,94±0,62*	68,3±4,5*	11,1±0,8*

* Различие с контролем статистически значимо.

Рис. 1. Влияние кофеина (а), коммерческой каталазы (б) и экстракта из голотурий (в) на уровень апоптоза в нейтрофилах крови крыс при воздействии ТсТҮр *in vitro* в течение 48 часов инкубации.

Для а: 1 – токсин, 0,2 мкг/мл; 2 – токсин, 0,2 мкг/мл + кофеин; 3 – токсин, 0,5 мкг/мл; 4 – токсин, 0,5 мкг/мл + кофеин. Для б: 1 – токсин, 0,2 мкг/мл + коммерческая каталаза; 2 – токсин, 0,5 мкг/мл + коммерческая каталаза. Для в: 1 – токсин, 0,2 мкг/мл + экстракт из голотурий, 1 мкг/мл; 2 – токсин, 0,5 мкг/мл + экстракт из голотурий, 1 мкг/мл. * Здесь и далее – разница с показателями при воздействии только ТсТҮр статистически значима.

поверхностных рецепторов клеток с флюоросцеином изотиоцианатом, конъюгированным с конканавалином А (кон А), проводили по методу McKenzie и Preston [8].

Результаты обрабатывали методами вариационной статистики. Для определения достоверности различий между группами использовали t-критерий Стьюдента.

Результаты исследования. Через 24 часа инкубации ТсТҮр в обеих концентрациях не влиял на жизнеспособность клеток, которая, как и в контроле, составила $97 \pm 2\%$. Однако через 48 часов токсин в концентрации 0,2 мкг/мл стимулировал жизнеспособность клеток на 26%. При окраске Hoeschst 33342 выявлено, что через 48 часов инкубации токсин в концентрации 0,2 мкг/мл снижал уровень апоптоза в 1,45 раза, а в концентрации 0,5 мкг/мл не оказывал на него значимого влияния (табл.).

ТсТҮр в концентрации 0,2 мкг/мл через 24 часа инкубации не влиял на активность каталазы нейтрофилов, а в концентрации 0,5 мкг/мл значительно ее повышал (в 3,3 раза по сравнению с контролем). Через 48 часов токсин в обеих концентрациях ингибировал активность каталазы (максимально – в 1,8 раза при концентрации 0,2 мкг/мл). Токсин в концентрации 0,2 мкг/мл через 24 часа также не оказывал влияния на активность ГР, а в концентрации 0,5 мкг/мл значительно ее повышал – в 5,9 раза по сравнению с контролем (табл.).

При исследовании мембраносвязанных эффектов токсина установлено, что в концентрации 0,2 мкг/мл он не оказывал достоверного влияния на связывание кон А с поверхностными рецепторами нейтрофилов через 24 часа инкубации, а через 48 часов повышал этот показатель в 1,4 раза. Токсин в концентрации 0,5 мкг/мл стимулировал связывание кон А уже через 24 часа, а через 48 часов, напротив, ингибировал его в 4,4 раза (табл.).

Использование кофеина как ингибитора цАМФ-фосфодиэстеразы показало, что он совместно с ТсТҮр в концентрации 0,5 мкг/мл через 48 часов снижал уровень апоптоза на 22% (по сравнению с действием одного токсина), и, напротив, кофеин увеличивал интенсивность апоптоза в 2 раза по сравнению с одним ТсТҮр в концентрации 0,2 мкг/мл (рис. 1, а). При введении экзогенной каталазы вместе с ТсТҮр в концентрации 0,2 мкг/мл уровень апоптоза повышался через 48 часов в 1,3 раза, а в концентрации 0,5 мкг/мл, напротив, снижался в 1,9 раза по сравнению с эффектами одного ТсТҮр (рис. 1, б). При одновременном введении ТсТҮр (0,2 мкг/мл) и экстракта из голотурий в концентрации 1 мкг/мл через 48 часов инкубации происходил рост уровня апоптоза в 2 раза (по сравнению с действием одного токсина). При концентрации ТсТҮр 0,5 мкг/мл экстракт из голотурий не влиял на этот показатель (рис. 1, в).

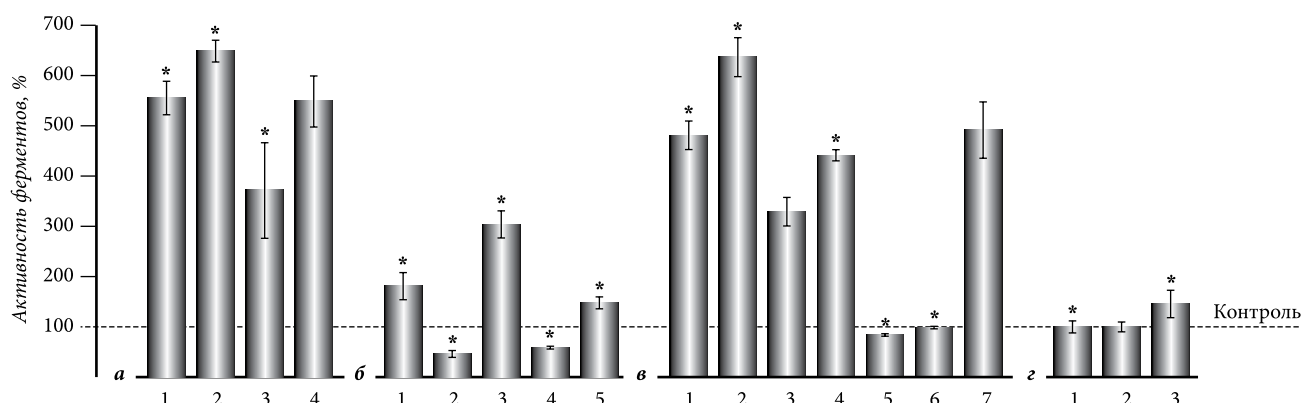


Рис. 2. Влияние кофеина (а), коммерческой каталазы (б) и экстракта из голотурий (в, г) на активность антиоксидантных ферментов в нейтрофилах крови крыс при воздействии ТсТГр *in vitro*.

Для а: 1, 2 – активность каталазы, 3, 4 – активность ГР при добавлении кофеина вместе с токсином в концентрации 0,2 мкг/мл (1, 3) или 0,5 мкг/мл (2, 4) через 24 часа инкубации. Для б: активность каталазы через 24 (1, 2) и 48 часов (3, 4) и активность ГР через 24 часа (5) в нейтрофилах крыс при добавлении коммерческой каталазы вместе с токсином в концентрации 0,2 мкг/мл (1, 3) и 0,5 мкг/мл (2, 4, 5). Для в: активность каталазы через 24 часа инкубации нейтрофилов с токсином (0,2 мкг/мл) и экстрактом из голотурий в концентрации 1 мкг/мл (1) и 10 мкг/мл (2) или ТсТГр (0,5 мкг/мл) и экстрактом из голотурий в концентрации 1 мкг/мл (3) и 10 мкг/мл (4); активность ГР через 24 часа инкубации нейтрофилов с токсином (0,2 мкг/мл) и экстрактом из голотурий в концентрации 1 мкг/мл (5) и 10 мкг/мл (6) или с токсином (0,5 мкг/мл) и экстрактом из голотурий в концентрации 1 мкг/мл (7). Для г: активность каталазы через 48 часов инкубации нейтрофилов с токсином (0,2 мкг/мл) и экстрактом из голотурий в концентрации 10 мкг/мл (1) или с токсином (0,5 мкг/мл) и экстрактом из голотурий в концентрации 1 мкг/мл (2) и 10 мкг/мл (3).

При совместном действии кофеина с токсином через 24 часа происходил рост активности каталазы по сравнению с действием одного токсина в 5 и 2 раза при концентрациях токсина 0,2 и 0,5 мкг/мл соответственно. При совместном введении кофеина и ТсТГр в концентрации 0,2 мкг/мл активность ГР через 24 часа также была выше, чем при действии одного ТсТГр (в 3,5 раза), но не изменялась по сравнению с влиянием ТсТГр в концентрации 0,5 мкг/мл (рис. 2, а). Добавление же экзогенной каталазы к нейтрофилам вместе с ТсТГр в концентрации 0,2 мкг/мл вызывало рост уровня суммарной (эндогенной и экзогенной) активности каталазы, который составил 72 и 350 % по сравнению с действием ТсТГр через 24 и 48 часов соответственно. При использовании токсина в концентрации 0,5 мкг/мл через 24 часа активность каталазы снижалась в 7,6 раза, а активность ГР – в 4 раза (по сравнению с действием одного токсина). В подобных же условиях активность каталазы через 48 часов значимо не изменялась (рис. 2, б). При этом добавление экстракта из голотурий в концентрациях 1 и 10 мкг/мл совместно с ТсТГр (0,2 мкг/мл) через 24 часа значительно повышало активность каталазы по сравнению с действием только ТсТГр (рис. 2, в), но практически не влияло на активность каталазы, если токсин использовали в концентрации 0,5 мкг/мл. Через 24 часа инкубации клеток с токсином (0,2 мкг/мл) и экстрактом из голотурий уровень активности ГР снижался в 1,9 и 1,6 раза, практически возвращаясь к контрольному. Но при одновременном применении ТсТГр (0,5 мкг/мл) и экстракта из голотурий (1 мкг/мл) влияния на уровень фермента не зарегистрировано. Через 48 часов экстракт из голотурий в концентрации 10 мкг/мл отменял ингибирующее влияние ТсТГр (0,2 мкг/мл) на каталазу, увеличивая ее активность в 2 раза (рис. 2, г). При введении экстракта из голотурий (1 мкг/мл)

вместе с токсином (0,5 мкг/мл) активность каталазы повышалась в 1,3 раза, а при концентрации экстракта 10 мкг/мл – в 1,9 раза по сравнению с действием одного токсина.

Кроме того, при совместном введении с ТсТГр (0,2 мкг/мл) кофеин через 24 часа повышал уровень связывания кон А с поверхностными рецепторами нейтрофилов в 1,7 раза. Через 48 часов при вышеуказанной концентрации токсина кофеин не влиял на уровень связывания кон А, а при концентрации ТсТГр 0,5 мкг/мл в 3 раза повышал его, практически возвращая к контрольному уровню (рис. 3, а). Экзогенная каталаза также стимулировала связывание кон А с поверхностными рецепторами нейтрофилов через 24 часа инкубации, тем самым отменяя ингибирующий эффект токсина (рис. 3, б). Через 48 часов каталаза, введенная вместе с ТсТГр (0,2 мкг/мл), уже практически не влияла на связывание кон А, но повышала ее при концентрации ТсТГр 0,5 мкг/мл. Экстракт из голотурий (1 мкг/мл) при совместном введении с ТсТГр (0,5 мкг/мл) возвращал показатель связывания кон А практически к контрольному уровню через 24 часа, а через 48 часов в 7,5 раза повышал интенсивность связывания по сравнению с изолированным эффектом ТсТГр (рис. 3, в). При совместном введении экстракта из голотурий в концентрации 10 мкг/мл с ТсТГр в концентрациях 0,2 и 0,5 мкг/мл связывание кон А через 48 часа возрастало в 1,4 и 5,9 раза соответственно (по сравнению с действием только ТсТГр).

Обсуждение полученных данных. Установлено, что термостабильный токсин *Y. pseudotuberculosis* в концентрации 0,5 мкг/мл индуцировал развитие апоптоза в нейтрофилах крови крыс через 48 часов инкубации. Однако в концентрации 0,2 мкг/мл токсин не оказывал существенного влияния на жизнеспособность нейтрофилов через 24 часа, а через 48 часов

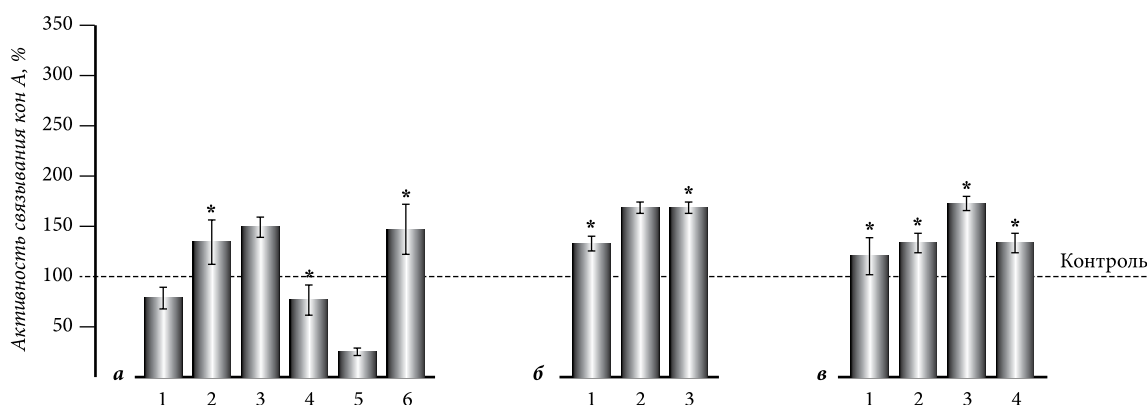


Рис. 3. Влияние кофеина (а), коммерческой каталазы (б) и экстракта из голотурий (в) на уровень связывания кон А поверхностными рецепторами нейтрофилов при воздействии ТсТҮр *in vitro*.

Для а: 1 – токсин, 0,2 мкг/мл, 24 часа; 2 – токсин, 0,2 мкг/мл + кофеин, 24 часа; 3 – токсин, 0,2 мкг/мл, 48 часов; 4 – токсин, 0,2 мкг/мл + кофеин, 48 часов; 5 – токсин, 0,5 мкг/мл, 48 часов; 6 – токсин, 0,5 мкг/мл + кофеин, 48 часов. Для б: 1 – токсин, 0,2 мкг/мл + каталаза, 24 часа; 2 – токсин, 0,2 мкг/мл + каталаза, 48 часов; 3 – токсин, 0,5 мкг/мл + каталаза, 48 часов. Для в: 1 – токсин, 0,5 мкг/мл + экстракт, 1 мкг/мл, 24 часа; 2 – токсин, 0,5 мкг/мл + экстракт, 10 мкг/мл, 48 часов; 3 – токсин, 0,5 мкг/мл + экстракт, 1 мкг/мл, 48 часов; 4 – токсин, 0,5 мкг/мл + экстракт, 10 мкг/мл, 48 часов.

даже стимулировал жизнеспособность и снижал уровень апоптоза по сравнению с контролем. При этом действие токсина на активность антиоксидантных ферментов зависело как от его концентрации, так и от времени инкубации. В первые 24 часа токсин активировал каталазу и ГР прямым концентрационно-зависимым образом. Однако через 48 часов отмечено снижение активности каталазы, при этом меньшая концентрация токсина вызывала больший эффект. Известно, что в иммунных клетках позвоночных существует тесная связь между продукцией активных форм кислорода и уровнем апоптоза [6]. Высокая оксидантная активность фагоцитов сбалансирована с высокой антиоксидантной активностью, что обеспечивает выживание клеток [12]. При воздействии ТсТҮр отмечено снижение уровня апоптоза нейтрофилов на фоне уменьшения активности каталазы. При этом более выраженное уменьшение активности этого фермента при концентрации токсина 0,2 мкг/мл может быть связано с более высоким уровнем продукции активных форм кислорода, чем при его большей концентрации.

Было показано, что через 48 часов инкубации с токсином в концентрации 0,2 мкг/мл активность каталазы в нейтрофилах повышалась и интенсивность апоптоза возрастала, и, напротив, при концентрации ТсТҮр 0,5 мкг/мл активность каталазы и интенсивность апоптоза достоверно снижались по сравнению эффектами самого ТсТҮр. Эти данные свидетельствуют в пользу предположения, что апоптоз в нейтрофилах при действии термостабильного токсина развивается на фоне снижения уровня продукции активных форм кислорода.

Известно, что оксиданты могут ингибировать экспрессию маннозосодержащего рецептора [5]. По-видимому, именно изменения в уровне продукции активных форм кислорода при воздействии ТсТҮр влияли на связывание поверхностных рецепторов

нейтрофилов с митогеном кон А. Было показано, что более низкая из концентраций ТсТҮр ингибировала связывание кон А с поверхностью нейтрофилов через 24 часа, а через 48 часов – стимулировала его. Более высокая концентрация, напротив, стимулировала связывание через 24 часа, а через 48 часов – ингибировала его. При этом введение экзогенной каталазы отменяло ингибирующий эффект токсина (0,2 мкг/мл) в отношении связывания кон А через 24, но не через 48 часов.

Вовлеченность в клеточный ответ рецепторов, включающих остаток маннозы, отмечен и в случае инфицирования *Leishmania donovani* [5]. Снижение уровня связывания кон А, в частности при воздействии токсина в концентрации 0,5 мкг/мл через 48 часов, может свидетельствовать о снижении экспрессии соответствующих рецепторов, в результате чего ослабляется «респираторный взрыв» в нейтрофилах в ответ на патоген. Таким образом, действие токсина, направленное на снижение выраженности клеточного ответа, по-видимому, играет роль в подавлении иммунитета хозяина при инфицировании *Y. pseudotuberculosis*. В целом, полученные результаты подтверждают выводы других авторов о том, что для развития апоптоза при действии иерсиний необходима блокировка «респираторного взрыва» [10]. Полученные данные свидетельствуют также о том, что продукция активных форм кислорода зависела от концентрации и времени воздействия токсина и была наибольшей при меньшей концентрации и меньшем сроке инкубации клеток.

В регуляции апоптоза могут участвовать митоген-активируемые и цАМФ-зависимые протеинкиназы [9]. Ранее было показано, что ТсТҮр способен модулировать уровень цАМФ в нейтрофилах крови человека [4]. Известно также, что циклазная система ограничивает «респираторный взрыв» в фагоцитах [11], а снижение уровня цАМФ может его интенсифицировать. В связи

с этим выявленные различия в действии ТсТур на уровень апоптоза нейтрофилов при различных его концентрациях могут быть связаны с различным дозозависимым влиянием на уровень цАМФ. Вовлеченность цАМФ в реализацию эффекта ТсТур в отношении нейтрофилов была исследована с использованием кофеина – ингибитора цАМФ-фосфодиэстеразы и индуктора повышения уровня внутриклеточного цАМФ и активности протеинкиназы А [13]. Кофеин потенцировал воздействие ТсТур на исследованные ферменты антиоксидантной системы (каталазы и ГР) через 24 часа, причем тем больше, чем меньше была концентрация токсина. Через 48 часов кофеин значительно повышал уровень связывания кон А с рецепторами на поверхности нейтрофилов и снижал уровень апоптоза по сравнению с действием одного ТсТур в дозе 0,5 мкг/мл. И, напротив, кофеин стимулировал апоптоз через 48 часов инкубации с ТсТур в концентрации 0,2 мкг/мл. Это подтверждает высказанное выше предположение о цАМФ-зависимых механизмах действия токсина.

Использование экстракта из голотурий при воздействии ТсТур выявило, что он оказывал прямое концентрационно-зависимое действие, которое зависело также от времени инкубации и концентрации токсина. Через 48 часов экстракт оказывал преимущественно стимулирующее действие на активность антиоксидантных ферментов, а в концентрации 10 мкг/мл даже увеличивал активность каталазы в 1,5 раза по сравнению с контролем. При этом он существенно стимулировал апоптоз нейтрофилов на фоне воздействия ТсТур в концентрации 0,2 мкг/мл (почти в 2 раза), но незначительно снижал выраженность апоптоза по сравнению с эффектом одного ТсТур в концентрации 0,5 мкг/мл. В то же время экстракт голотурий в концентрации 1 мкг/мл стимулировал связывание кон А по сравнению с действием только ТсТур в концентрации 0,5 мкг/мл. В целом, действие экстракта из голотурий было направлено на снижение или отмену эффектов токсина и стимуляцию функциональной активности клеток. Сходная направленность действия с кофеином свидетельствует в пользу предположения о цАМФ-зависимом эффекте экстракта из голотурий при воздействии термостабильного токсина *Y. pseudotuberculosis*.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ № 08-04-99141.

Литература

1. Долматова Л.С., Ромашина В.В. Особенности изменения активности антиоксидантных ферментов в различных типах лейкоцитов крови у больных хроническим алкоголизмом // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2003. № 2. С. 17–19.
2. Долматова Л.С., Тимченко Н.Ф., Стасенко Н.Я. Характеристика состава и медико-биологические исследования комплекса биологически активных веществ из дальневосточных видов голотурий // Дальневосточные моря России.

Книга 2. Исследование морской экологии и биоресурсов. М.: Наука, 2007. С. 684–694.

3. Сомов Г.П., Покровский В.И., Беседнова Н.Н., Антоненко Ф.Ф. Псевдотуберкулез. М.: Медицина, 2001. 254 с.
4. Тимченко Н.Ф., Недашковская Е.П., Долматова Л.С., Сомова-Исачкова Л.М. Токсины *Yersinia pseudotuberculosis*. Владивосток: Примполиграфкомбинат, 2004. 219 с.
5. Chakraborty P., Ghosh D., Basu M.K. Modulation of macrophage mannose receptor affects the uptake of virulent and avirulent *Leishmania donovani* promastigotes // J. Parasitol. 2001. Vol. 87, No. 5. P. 1023–1027.
6. Davis W., Ronae Z., Tew K. Cellular thiols and reactive oxygen species in drug-induced apoptosis // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2001. Vol. 296, No. 1. P. 1–6.
7. Komatsu N., Oda T., Muramatsu T. Involvement of both caspase-like proteases and serine proteases in apoptotic cell death induced by ricin, modeccin, diphtheria toxin, and *Pseudomonas* toxin // J. Biochem. 1998. Vol. 124. P. 1038–1044.
8. McKenzie A.N.J., Preston T.M. Functional studies on *Calliphora vomitoria* haemocyte subpopulations defined by lectin staining and density centrifugation // Develop. Comp. Immunol. 1992. Vol. 16, No. 1. P. 19–30.
9. Nakamura A., Imaizumi A., Yanagawa Y. et al. β 2 – Adrenoceptor activation inhibits Shiga toxin2-induced apoptosis of renal tubular epithelial cells // Biochem. Pharmacol. 2003. Vol. 66. P. 343–353.
10. Ruckdeschel K. Immunomodulation of macrophages by pathogenic *Yersinia* species // Arch. Immunol. Ther. Exp.-Warsz. 2002. Vol. 50, No. 2. P.131–137.
11. Thelen M., Dewald B., Baggolini M. Neutrophil signal transduction and activation of the respiratory burst // Physiol. Rev. 1993. Vol. 73, No. 4. P. 797–821.
12. Thiel M., Zourelidis C., Peter K. Die Rolle der polymorphkernigen neutrophilen Leukozyten in der Pathogenese des akuten Lungenversagens (ARDS) // Anaesthesist. 1996. Bd. 45. S. 113–130.
13. Wang L., Lu L. Pathway-specific effect of caffeine on protection against UV irradiation-induced apoptosis in corneal epithelial cells // Investigative Ophthalmology and Visual Science. 2007. Vol. 48. P. 652–660.

Поступила в редакцию 15.02.2010.

STUDYING MECHANISMS OF APOPTOSIS-MODULATING ACTIVITY OF THERMORESISTANT TOXIN *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* AND CORRECTIVE EFFECT OF FAR-EASTERN HOLOTHURIANS-DERIVED EXTRACT IN RAT NEUTROPHILS IN VITRO

L.S. Dolmatova¹, O.A. Zaika¹, E.P. Nedashkovskaya², N.F. Timchenko²

¹ Il'ichev Pacific Oceanological Institute, FEB RAS (43 Baltiyskaya St. Vladivostok 690041 Russia), ² Research Institute of Epidemiology and Microbiology, SB RAMS (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russia)

Summary – The thermoresistant lethal toxin *Y. pseudotuberculosis* has concentration-dependent effect on the activity of antioxidant enzymes, apoptosis and viability of neutrophils and binding of surface cell receptors and concanavalin A *in vitro*. This effect also depends on the duration of hatching. The results of experiments on simultaneous introduction of this toxin with phosphodiesterase inhibitor (caffeine) and commercial catalase are indicative of the fact that the effects from the toxin depend on cyclic adenosine monophosphate content in cells. The apoptosis progresses when the antioxidant enzyme increase. The extract derived from the Far Eastern holothurians allows preventing inhibitory activity of this toxin on binding cell receptors to concanavalin A and inducing apoptosis and activity of antioxidant enzymes, thus increasing functional activity of neutrophils.

Key words: *Yersinia pseudotuberculosis*, bacterial toxins, holothurians-derived extract, neutrophils.

Pacific Medical Journal, 2010, No. 3, p. 76–80.