

ВЛИЯНИЕ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ПОРИНОВ НАРУЖНОЙ МЕМБРАНЫ *Yersinia pseudotuberculosis* НА ТКАНИ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА МЫШЕЙ

© 2023 О.Ю. Портнягина^{1*}, Д.Н. Ивашкевич², И.В. Дюйзен²,
Л.С. Шевченко¹, О.Д. Новикова¹

¹ Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН им. Г.Б. Елякова,
690021 Владивосток, Россия

² Национальный научный центр морской биологии ДВО РАН им. А.В. Жирмунского,
690041 Владивосток, Россия; электронная почта: odd64@mail.ru

Поступила в редакцию 03.08.2022

После доработки 25.11.2022

Принята к публикации 20.12.2022

Обнаружено, что при однократной иммунизации мышей OmpF и OmpC поринами *Yersinia pseudotuberculosis* на фоне нарастающего титра специфических антител в глубоких слоях коры головного мозга развиваются патологические изменения, характеризующиеся дистрофическими изменениями клеток. В нейронах при этом наблюдается повышенный уровень экспрессии каспазы 3, что свидетельствует об индукции проапоптотических сигнальных путей. Полученные результаты указывают на потенциальную способность неспецифических порообразующих белков наружной мембраны грамотрицательных бактерий инициировать развитие дегенеративных изменений клеток головного мозга.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *Yersinia pseudotuberculosis*, OmpF, OmpC порины, нейродегенерация, каспаза 3, апоптоз.

DOI: 10.31857/S0320972523010104, EDN: PCTBZM

ВВЕДЕНИЕ

Грамотрицательная бактерия *Yersinia pseudotuberculosis* (сем. Yersiniaceae) является энтеропатогеном для человека, вызывает острые желудочно-кишечные расстройства, такие как энтероколит и мезентериальный лимфаденит. В случае повторной bacteriemии у больных псевдотуберкулезом могут развиваться так называемые вторично-очаговые формы заболевания, которые характеризуются офтальмологическими симптомами, такими как эписклерит, склерит, хориоретинит, симптомами поражения периферической нервной системы, а также возникновением реактивного артрита и коллагенозов [1, 2]. Есть данные, что в 9–25% случаях при наличии генетической предрасположенности или различных факторов риска патологический процесс проявляется не только как инфекционный синдром, но и приобретает черты системного заболевания. В таких

случаях у больных иерсиниозом или псевдотуберкулезом формируются различные аутоиммунные расстройства, такие как синдромы Рейтера и Шегрена – Гужеро, болезни Крона, Грейвса – Базедова, а также хронические заболевания соединительной ткани, гломерулонефрит, аутоиммунный гепатит, гемолитическая анемия, воспаление сердечных оболочек, тромбоцитопения и другие патологии. Некоторые авторы рассматривают подобные заболевания как закономерные последствия иерсиниозов [1–5]. В 40% случаях у переболевших иерсиниозами отмечаются поражения нервной системы в виде серозного или гнойного менингита, менингоэнцефалита, невралгий и болей в пояснично-крестцовом отделе позвоночника [6–8]. Описан случай развития острой энцефалопатии у пациента с серологически подтвержденным псевдотуберкулезом [9].

Предполагается, что подобные осложнения связаны с нарушением функции Т- и

Принятые сокращения: ЛПС – липополисахарид; НМ – наружная мембрана; РВ – полимиксин В.

* Адресат для корреспонденции.

антигенпрезентирующих клеток в поражённом органе. Антигены *Y. pseudotuberculosis* могут вызывать неспецифическую активацию Т-клеток за счёт прямого взаимодействия с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса II и с вариабельной областью Т-клеточного рецептора, а эта поликлональная активация, в свою очередь, приводит к гиперпродукции провоспалительных цитокинов [9, 10], которые способствуют развитию нейровоспаления [11].

В настоящее время существует достаточное количество различных патогенетических признаков, свидетельствующих о том, что хронические бактериальные и вирусные инфекции являются возможными факторами риска развития нейродегенеративных заболеваний [12, 13]. Однако молекулярный механизм взаимодействия бактериальных патогенов с нейронами мало изучен. Тем не менее уже сейчас ясно, что проникновение бактериальных антигенов в ткань мозга и последующая нейровоспалительная реакция в долгосрочной перспективе могут инициировать нейродегенеративные расстройства [14]. Иммунный ответ и активация воспалительного процесса в ходе развития инфекции в организме-хозяине также могут вызывать повреждение и последующую гибель нейронов.

Известно, что развитию нейродегенерации способствует бактериальный эндотоксин, липополисахарид (ЛПС) [15], который является одним из основных факторов патогенности грамотрицательных бактерий. Однако, помимо ЛПС, к факторам патогенности можно отнести и порообразующие белки (порины), которые доминируют в количественном отношении среди белков наружной мембраны (НМ) бактерий [16–19]. В ходе инфекционного процесса порины высвобождаются из НМ в результате бактериолиза и могут интегрироваться, например, во внутреннюю мембрану митохондрий, что приводит к нарушению потенциала митохондриальной мембраны, высвобождению цитохрома *c* и индукции апоптоза [20]. Так, на примере неспецифического OmpC порина *E. coli* было показано, что пориновые белки вызывают развитие Са-зависимой апоптотической гибели клеток и наряду с ЛПС участвуют в развитии нейровоспалительного процесса, приводящего к нейродегенеративным изменениям в тканях головного мозга [21].

Известно, что при иммунизации поринами формируется высокий уровень долгоживущих циркулирующих антител, более того, специфические антипориновые антитела обнаруживаются в сыворотках крови экспериментальных животных (мышей, кроликов, крыс, обезьян)

вне зависимости от формы вводимого антигена, т.е. при иммунизации целыми клетками, фрагментами клеточной стенки бактерий, изолированными белками [22–24]. В связи с этим считается, что порины НМ различных бактерий могут быть использованы в качестве эффективных компонентов вакцинных препаратов для защиты человека и животных от заболеваний, вызываемых микроорганизмами родов *Neisseria*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Yersinia*, *Pasteurella*, *Aeromonas*, *Chlamydia* [25–31]. Однако исследование нейротоксического потенциала поринов патогенных для человека грамотрицательных бактерий находится в настоящее время на начальном этапе и в связи с этим представляется весьма актуальной задачей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы и условия культивирования. Для получения препаратов поринов использовали бактерии *Y. pseudotuberculosis* (штамм 598, Ib серовар). Культуры выращивали в жидкой питательной среде LB при температуре 4 °C в течение 5 суток и при температуре 37 °C в течение 30 ч для получения OmpF и OmpC белков соответственно.

Выделение OmpF и OmpC поринов. Выделение и очистку белков из бактериальных клеток проводили, как описано в работе Новиковой и соавт. [32]. В результате были получены электрофоретически чистые препараты белков в нативной тримерной форме. Содержание ЛПС в образцах белков, определённое с помощью набора *Limulus Amebocyte Lysate (LAL) test* («Thermo Fisher Scientific», США) в соответствии с протоколом производителя, составило <3%. Полученные образцы тримеров белков использовали для иммунизации мышей.

Иммунизация мышей. Мышей линии BALB/c (самки в возрасте от 4 до 8 недель, массой 20 ± 2 г), разделённых на три группы по 15 голов, однократно иммунизировали внутрибрюшинно: (1) тримером OmpF порина *Y. pseudotuberculosis* (100 мкг/мышь), (2) тримером OmpC порина *Y. pseudotuberculosis* (100 мкг/мышь), (3) Tris-HCl буфером (0,03 М, pH 7,6) (100 мкл).

Забор биологического материала. Забор крови и тканей головного мозга у 5 мышей из каждой группы осуществляли через 90, 180 и 280 дней после начала эксперимента. Мышей наркотизировали введением 10 мкл смеси ксилазина («Interchemie», Эстония) и телазола («Zoetis Manufacturing», Испания). По достижении глубокого уровня хирургического наркоза животное

фиксируют на препаровочном столике, вскрывают грудную клетку и отбирают кровь из полости сердца. Перфузию 10%-ным (v/v) формалином в физиологическом растворе производили через систему кровообращения. Затем вскрывали черепную коробку, извлекали головной мозг, отделяли кору и фиксировали в формалине. Перед извлечением головного мозга для приготовления гомогенатов перфузию не проводили.

Экстракция белков из тканей головного мозга. *Экстракция 1%-ным Triton X-100.* Навеску тканей головного мозга гомогенизировали тefлоновым пестиком в TBS-буфере (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4), содержащем 0,1 mM PMSF и 1%-ный (v/v) Triton X-100. Затем гомогенат обрабатывали ультразвуком в течение 20 с при 44 Гц с помощью дезинтегратора (УЗДН-2Т, Россия). Полученную суспензию центрифугировали при 15 000 g в течение 20 мин, получали осадок 1 и супернатант 1. К супернатанту 1 добавляли ацетон (1 : 9, v/v) и выдерживали в течение ночи при -20 °C для осаждения растворимых в Triton X-100 белков. Полученный осадок отделяли центрифугированием при 5000 об./мин в течение 30 мин, дважды промывали водой, нерастворимые в воде белки далее растворяли в буфере (0,03 M Tris-HCl, pH 7,6), содержащем 0,25% Ds-Na (v/v), и использовали для анализа.

Экстракция 1%-ным Ds-Na. Осадок 1 обрабатывали 1%-ным (v/v) раствором Ds-Na в TBS-буфере в течение 45 мин при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Полученный экстракт центрифугировали при 15 000 g в течение 25 мин, получали осадок 2 и супернатант 2. К супернатанту 2 добавляли ацетон (1 : 9, v/v) и выдерживали в течение ночи при -20 °C для осаждения растворимых в Ds-Na белков. Полученный осадок отделяли центрифугированием при 5000 об./мин в течение 30 мин, дважды промывали водой, нерастворимые в воде белки далее растворяли в буфере (0,03 M Tris-HCl, pH 7,6), содержащем 0,25% Ds-Na (v/v), и использовали для анализа.

Концентрацию белка в полученных экстрактах определяли по УФ-спектрам в максимуме поглощения при 280 нм с помощью спектрофотометра μ Quant («BioTek Instruments, Inc.», США).

Иммуноферментный анализ. Образцы белков, извлекаемые из тканей головного мозга с помощью 1%-ного Triton X-100 и 1%-ного Ds-Na, использовали в качестве антигенов для проведения ИФА. Концентрация белка, наносимого на планшеты в качестве антигена, составила 5 мкг/мл. ИФА проводили по стандартной методике. Планшеты инкубировали

в течение ночи при 4 °C. Для обнаружения антигенов использовали антисыворотки мышей (в разведении 1 : 200, v/v), полученных после трёхкратной иммунизации OmpF и OmpC поринами *Y. pseudotuberculosis*, как описано в статье Новиковой и соавт. [32]. В качестве антител к иммуноглобулинам мыши использовали коммерческие конъюгаты с пероксидазой хрена («Invitrogen», США). Результаты учитывали на спектрофотометре μ Quant («BioTek Instruments, Inc.») при 492 нм, в качестве хромогена использовали 0,04%-ный (m/v) раствор о-фенилендиамина. Антисыворотки, полученные после однократной иммунизации мышей, также анализировали в ИФА с гомологичными антигенами. Уровень антител выражали в отрицательных lg ($-lg$).

Иммуногистохимическое и гистологическое исследование. Ткани коры головного мозга фиксировали в течение 24 ч при 4 °C в 10%-ном (v/v) забуференном формалине, 3–4 раза промывали фосфатным буфером (0,1 M, pH 7,2), заливали в парафин и готовили срезы толщиной 5 мкм.

Для выявления каспазы 3, TNF- α , IL-2 и IL-6 был использован иммунопероксидазный метод с применением первичных антител соответственно к CASP3 (PAA626Mu01, «Cloud-Clone Corp.», США), TNF- α (PAA133Mu01, «Cloud-Clone Corp.»), IL-2 (PAA043Mu01, «Cloud-Clone Corp.») и IL-6 (PAA079Mu01, «Cloud-Clone Corp.») в разведении 1 : 200, v/v. Вторичные антитела, меченные пероксидазой хрена (PI-2000, «Vector Laboratories», США), в разведении 1 : 200, v/v, использовали в соответствии с инструкциями фирмы-производителя.

Парафиновые срезы коры головного мозга после депарафинирования инкубировали в 3%-ной (v/v) перекиси водорода для блокирования эндогенной пероксидазы. Промывали 3 раза фосфатным буфером (0,1 M, pH 7,2) и инкубировали в течение 60 мин в 2%-ном (m/v) растворе БСА (SC-2323, «Santa Cruz Biotechnology», США), содержащем 0,25%-ный (v/v) Triton X-100. Инкубацию с первичными антителами проводили во влажной камере при 4 °C в течение 24 ч. После трёхкратной отмывки срезы инкубировали со вторичными антителами в течение 60 мин и трижды отмывали фосфатным буфером. Для визуализации иммунопероксидазной реакции использовали хромоген NovaRed («Vector Laboratories»), через 5–10 мин срезы промывали фосфатным буфером, обезвоживали и заключали в бальзам.

Для выявления исследуемых поринов в коре головного мозга использовали антисыворотки мышей, трёхкратно иммунизированных

OmpF и OmpC поринами *Y. pseudotuberculosis*, полученными как описано в статье Новиковой и соавт. [32], а также сыворотки интактных особей в качестве контроля. После инкубации срезов в блокирующем буфере в течение 1 ч при 37 °С проводили трёхкратную отмывку фосфатным буфером, затем срезы инкубировали 1 ч со вторичными антителами, меченными Alexa Fluor 594 (A11037, «Life Technologies», США) и Alexa Fluor 488 (A11029, «Life Technologies»). Гистологические препараты отмывали трижды фосфатным буфером, затем инкубировали 10 мин с красителем DAPI (D021490, «Life Technologies»), заключали под покровное стекло с использованием глицерина, стекла хранили в холодильнике при температуре 4 °С.

Для гистологического окрашивания депарфинированные срезы помещали на 5 мин в раствор гематоксилина Карацци («Bio-Vitrum», Россия), промывали проточной водой, обезвоживали, просветляли и заключали в баллаз.

Количественная обработка данных. Морфометрическую, иммуногистохимическую оценку и подсчёт клеток проводили с использованием пакета программ ImageJ 1.41 («NIH», США). Удельную плотность нейронов определяли как (количество нейронов)/(площадь подсчёта), затем стандартизировали по контрольному значению. Количество Casp3⁺-нейронов/мм³ рассчитывали по формуле: $d = (10^9 \times n) / (S \times 7)$, где d — плотность клеток; 10^9 — коэффициент пересчёта мкм² в мм²; n — количество иммунопозитивных клеток; S — площадь области интереса (мкм²); 7 — толщина среза (мкм).

Статистическая обработка данных. Оценку достоверности различий данных проводили с использованием метода Two-way ANOVA (Bonferroni post test). Все данные были проверены на нормальность распределений с использованием теста Колмогорова—Смирнова. Данные выражали как среднее $\pm$ SEM, $p < 0,05$ было принято как статистически значимое. Все статистические тесты выполнялись с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 4.00 («GraphPad Software», США). Корреляцию между снижением удельной плотности нейронов и увеличением числа Casp3⁺-нейронов оценивали по средним значениям в динамике с применением критерия Спирмена. Силу корреляции определяли с помощью шкалы Чеддока. Статистический анализ различий взаимодействия антигенов с антителами проводили с использованием t -критерия Стьюдента. Данные выражали как среднее $\pm$ SD, $p < 0,05$ было принято как статистически значимое.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Объектами исследования в настоящей работе стали неспецифические OmpF и OmpC порины *Y. pseudotuberculosis*, которые наряду с ЛПС относятся к основным (в количественном отношении) антигенам НМ псевдотуберкулёзного микроба. Ранее было показано, что при естественном течении заболевания в сыворотках крови пациентов антитела к поринам в диагностических титрах определяются, начиная с первой недели от начала проявления клинических симптомов заболевания, и могут сохраняться на протяжении нескольких месяцев и даже лет [22]. При искусственной иммунизации индивидуальными белками у животных формируется пул специфических антипоринных антител с высокими титрами. Показано, что порины иерсиний относятся к антигенам, для которых применимо понятие «молекулярная мимикрия», вследствие чего длительно циркулирующие в организме антитела к этим белкам способны вызвать, например, развитие аутоиммунного поражения щитовидной железы с развитием тиреотоксикоза [33]. Накопление специфических антител в организме, так же как провоспалительных цитокинов, может спровоцировать нейровоспалительный процесс и стать причиной деструкции нервной ткани при различных нейродегенеративных заболеваниях [11, 34].

В ходе проведённого эксперимента мышей через 90, 180 и 280 дней после иммунизации OmpF/OmpC поринами *Y. pseudotuberculosis* подвергали эвтаназии, извлекали мозг и проводили гистологический анализ срезов коры, сделанных в области поясной извилины (молекулярной пластинки — слоя 1 и наружной зернистой пластинки — слоя 2). На парафиновых срезах (5 мкм), окрашенных гематоксилином-эозином, проводили подсчёт плотности распределения нейронов в поверхностных и глубоких слоях серого вещества, оценивали степень и глубину повреждения нервных клеток по характеру изменения ядра и цитоплазмы (пикноз, вакуолизация).

Основной тенденцией общеморфологических изменений, регистрируемых в мозге экспериментальных животных, стало значительное сокращение плотности распределения нервных клеток (рис. 1, а, б).

Через 90 дней после начала эксперимента появились признаки дистрофических изменений в нейронах (рис. 1, в). Они сопровождались частичной вакуолизацией цитоплазмы, растворением и распылением тигроида, набуханием

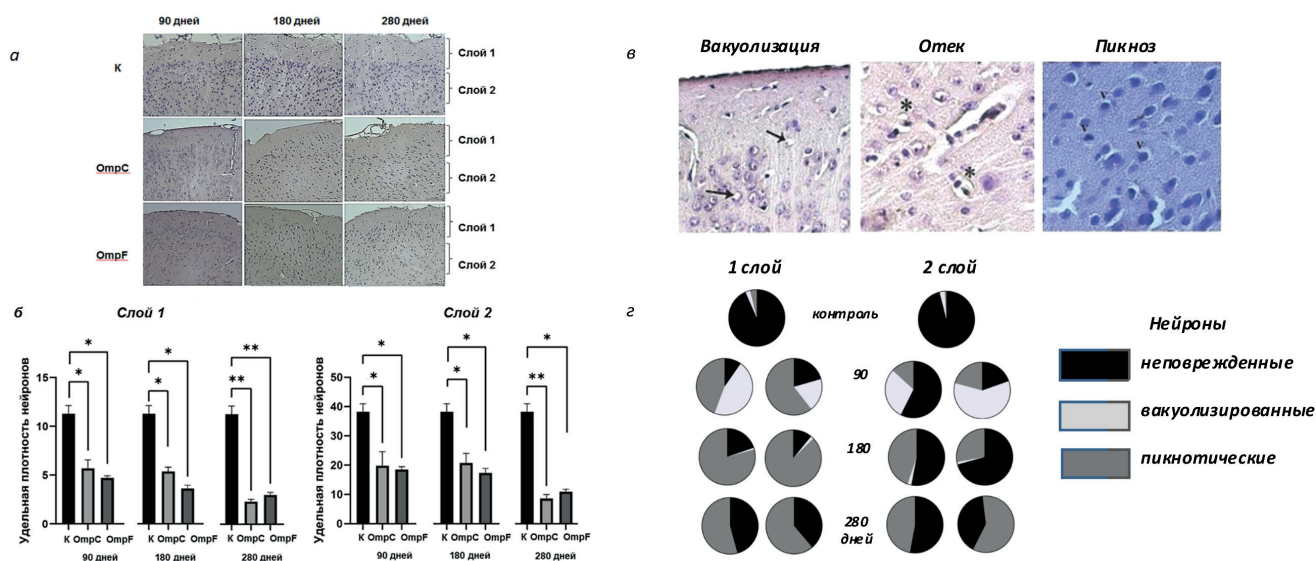


Рис. 1. Гистологический анализ срезов коры головного мозга иммунизированных мышей, сделанных в области поясной извилины (молекулярной пластинки — слой 1 и наружной зернистой пластинки — слой 2). Оценка удельной плотности клеток (а, б). Морфологические изменения структур коры головного мозга иммунизированных мышей (в, г), выраженные как изменения соотношения нейронов в клетках молекулярной пластинки (слой 1) и наружной зернистой пластинки (слой 2). На фотографиях (в) указаны клетки с признаками вакуолизации (↑), отека (*), пикнотические (V), на рисунке (г) приведены данные для ОмрF порина (слева) и ОмрС порина (справа). * Достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$, ** достоверное отличие от контроля, $p < 0,01$

и формированием перичеллюлярного отёка. В случае иммунизации как ОмрF, так и ОмрС поринами менее 25% нейронов в тканях молекулярной пластинки (слой 1) остались неповреждёнными (рис. 1, г). В наружной зернистой пластинке (слой 2) при введении ОмрF порина остались неповреждёнными порядка 60% нейронов, насчитывалось также примерно 10% вакуолизированных нейронов. В 30% пикнотических клеток наблюдались признаки деструкции органоидов. В случае иммунизации ОмрС порином неповреждёнными остались около 20% клеток, насчитывалось такое же количество пикнотических нейронов, а в большей части нейронов наблюдалась вакуолизация цитоплазмы. Описанные морфологические изменения были зафиксированы на фоне резкого (примерно в 2 раза) сокращения удельной плотности нейронов.

Через 180 дней от начала наблюдения плотность распределения нейронов уменьшалась более чем в 4 раза, и наблюдались глубокие морфологические изменения, которые были выражены неодинаково в поверхностных и более глубоких слоях коры. Так, независимо от вида введённого белка, в клетках молекулярной пластинки значительно, до 80–85%, возрастало количество пикнотических нейронов с признаками необратимых изменений (сморщивание, уплотнение цитоплазмы нейрона, развитие гиперхроматоза). В клетках зернистой пластинки количество пикнотических нейронов также увеличивалось, но при этом от 50 до 70% кле-

ток не демонстрировали явных признаков дистрофического повреждения (рис. 1, г).

Через 280 дней в нейронах молекулярной пластинки были зафиксированы ультраструктурные признаки компенсаторно-репаративных процессов, количество пикнотических клеток уменьшалось, а количество клеток с признаками относительного морфологического благополучия увеличивалось. Напротив, в нейронах наружной зернистой пластинки количество пикнотических нейронов продолжало увеличиваться, а неповреждённых — уменьшаться (рис. 1, г). В случае ОмрС порина изменения были более заметными по сравнению с ОмрF.

В результате проведённых иммунохимических исследований было показано, что накопление морфологических изменений в клетках коры головного мозга развивалось на фоне сформировавшегося пула специфических антител в сыворотках крови иммунизированных мышей. Через 90 дней после однократной иммунизации мышей ОмрF порином *Y. pseudotuberculosis* у животных наблюдался достаточно высокий уровень IgG-антител (титр 10^3), который вплоть до окончания эксперимента (280 дней) не только не снижался, но и имел тенденцию к нарастанию. Динамика антителообразования в случае иммунизации животных ОмрС порином имела иной характер. Через 90 дней количество специфических антител в сыворотках крови мышей достигало того же уровня, что и у мышей, иммунизированных ОмрF порином. Через 180 дней титр

антисыворотки снижался до $-lg 2,6$, а в конце срока наблюдения (280 дней) опять повышался до $-lg 3,2$.

Ранее в статье Rajan et al. [21] были приведены данные о том, что в тканях головного мозга людей с диагностированной болезнью Крейцфельда—Якоба и мышей, иммунизированных OmpC порином из НМ *E. coli*, с помощью специфических антител выявляется присутствие белкового антигена. В нашем эксперименте анализ экстрактов коры головного мозга мышей показал, что в образцах тканей, полученных через 90 дней после иммунизации, присутствуют антигены, взаимодействующие с антисыворотками к OmpF/OmpC поринам, полученными как описано в работе Новиковой и соавт. [32] (рис. 2, а, б).

Через 180 дней антигены, взаимодействующие в ИФА с антисывороткой к OmpC порину, были обнаружены в количестве примерно вдвое меньше по сравнению с 90-дневными экстрактами. А в экстрактах тканей мозга мышей после иммунизации OmpF порином через 180 дней количество определённого антигена было статистически неотличимо от контроля.

В экстрактах тканей головного мозга, взятого у мышей через 280 дней, антигены, связывающиеся со специфическими антителами

к поринам, методом ИФА обнаружены не были. Однако при иммуногистохимическом исследовании, проведённом с использованием специфических поликлональных антител к поринам и вторичных антител к IgG мыши, меченных Alexa Fluor, в препаратах тканей головного мозга, полученных при иммунизации как OmpC, так и OmpF белками, были обнаружены слабые сигналы зелёной флуоресценции, свидетельствующие о присутствии незначительного количества этих антигенов в исследуемых образцах (рис. 2, б, г).

Интересно отметить различную эффективность последовательной экстракции белков неионным (Triton X-100) и анионным (Ds-Na) детергентами. В случае OmpF порина, наибольшее его количество экстрагировалось из тканей 1%-ным Ds-Na, а в случае OmpC белка — 1%-ным Triton X-100. Вероятно, такой результат обусловлен различной способностью исследуемых поринов взаимодействовать с мембранной нейтронов. Механизм инкорпорации PorA и PorB поринов в мембраны эукариотических клеток с образованием ионных каналов описан для поринов НМ из различных видов нейссерий [35, 36]. Так, например, установлено, что PorB из *Neisseria gonorrhoeae*, встраиваясь в мембраны эпителиальных клеток, не только формирует функционирующие каналы, но и вызывает

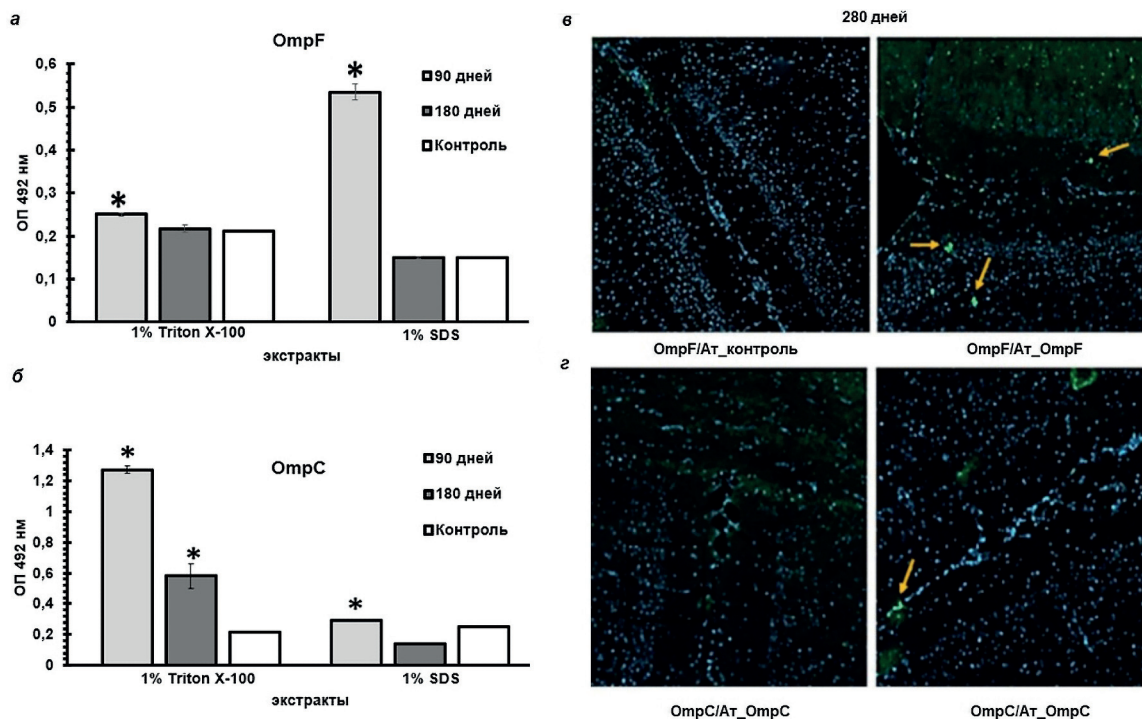


Рис. 2. Иммунодетекция антигенов. Иммуноферментный анализ взаимодействия (а, в) экстрактов тканей коры головного мозга, полученных через 90, 180, 280 дней от мышей, иммунизированных однократно OmpF и OmpC поринами *Y. pseudotuberculosis* (100 мкг/мышь), с антисыворотками к гомологичным белкам (разведение 1 : 200). Концентрация белка на планшете 5 мкг/мл. * Достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$. Иммуногистохимическое выявление поринов (б, г) (указано стрелками) в тканях коры головного мозга мышей через 280 дней после введения антигенов. Взаимодействие гистологических препаратов с неиммунной (OmpF/At_контроль, OmpC/At_контроль) и специфической (OmpF/At_OmpF, OmpC/At_OmpC) сыворотками

их Са-зависимый апоптоз. При нейродистрофических процессах высокий уровень апоптоза также может приводить к выраженному снижению численности жизнеспособных клеток. За развитие апоптоза отвечают внутриклеточные ферменты семейства цистеин-содержащих протеаз, среди которых ведущей эффекторной каспазой является каспаза 3. При болезнях Альцгеймера и Паркинсона в коре головного мозга пациентов, умерших от этих заболеваний, обнаруживается высокий уровень экспрессии каспазы 3 [37, 38]. Повышенный уровень мРНК каспазы 3 также определялся в тканях головного мозга мышей, иммунизированных препаратами OmpC порина *E. coli* [21]. По мнению авторов, этот факт свидетельствует о том, что бактериальный порин способствует развитию патологического состояния нейронов вследствие повреждения мембран и развития апоптоза.

Цитологические изменения, которые мы наблюдали в клетках коры головного мозга иммунизированных мышей, по ряду признаков (пикноз, гиперхроматоз) можно было отнести к апоптотическим. Для того чтобы выявить готовность нейронов мышей к апоптозу, был проведён гистохимический анализ с использованием специфических поликлональных антител к каспазе 3 (PAA626Mu01, «Cloud-Clone Corp.»).

Как видно из данных, приведённых на рис. 3, однократная иммунизация животных исследуемыми бактериальными поринами вызвала значительное увеличение экспрессии каспазы 3 в клетках молекулярной пластинки (слой 1) и наружной зернистой пластинки (слой 2) коры. В клетках наружной зернистой пластинки эффект от введения препаратов белков был более выражен, количество нейро-

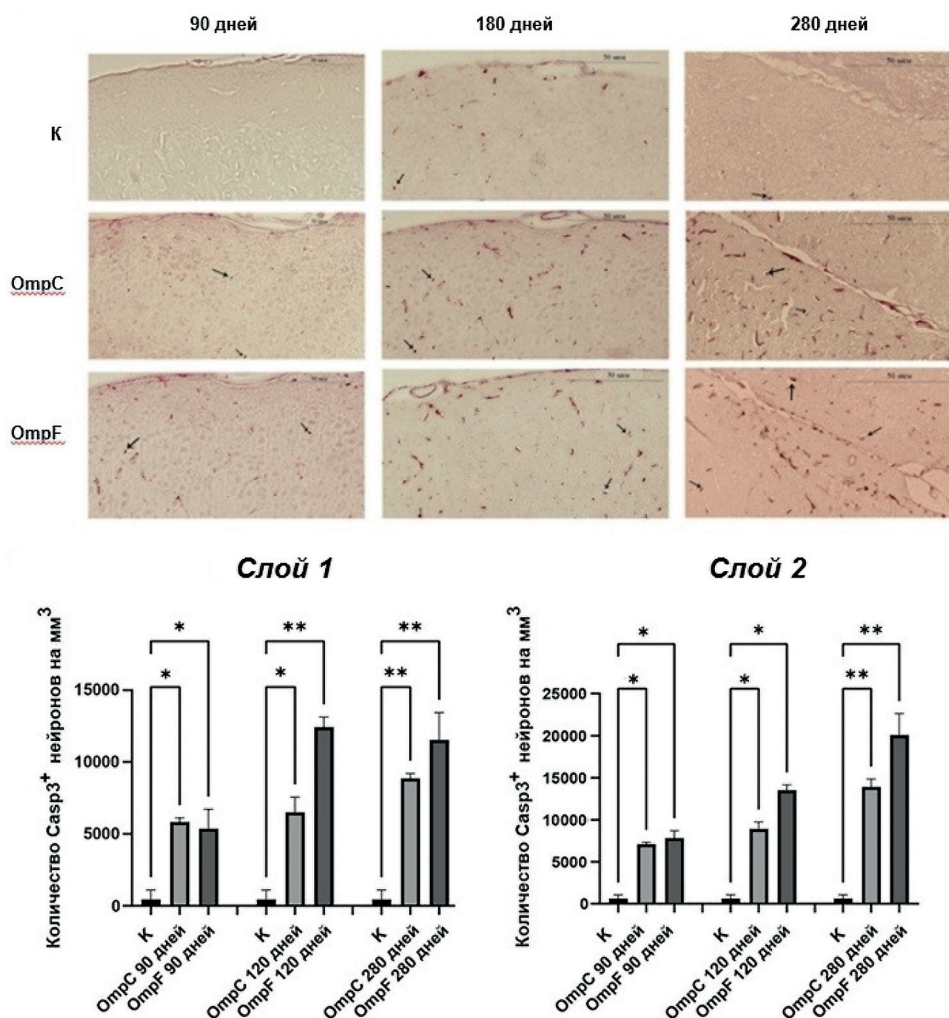


Рис. 3. Экспрессия каспазы 3 (Casp3) в клетках молекулярной пластинки (слой 1) и наружной зернистой пластинки (слой 2) коры головного мозга мышей, иммунизированных OmpF/OmpC поринами *Y. pseudotuberculosis*. Слой 1, коэффициент корреляции Спирмена для OmpC – 1,000, для OmpF – 0,500; сила связи по шкале Чеддока для OmpC функциональная, для OmpF заметная. Слой 2, коэффициент корреляции Спирмена для OmpC – 0,500, для OmpF – 1,000; сила связи по шкале Чеддока для OmpC заметная, для OmpF функциональная. Стрелками указаны Casp3⁺-нейроны. К – контроль. * Достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$, ** достоверное отличие от контроля, $p < 0,01$

нов, продуцирующих каспазу 3, нарастало до конца эксперимента, что особенно заметно в случае OmpF порина. В клетках молекулярной пластинки динамика накопления Casp3⁺-нейронов имела аналогичный характер, хотя количество их было меньше по сравнению с клетками слоя 2 (рис. 3).

Известно, что патогенные иерсинии обладают целым набором разнообразных по механизму действия факторов вирулентности, которые нарушают защитные реакции врождённого и адаптивного иммунитета, способствуя распространению бактерий в теплокровном организме. Основным активатором клеток иммунной системы традиционно считается эндотоксин (ЛПС). Так, известно, что ЛПС из *Y. pseudotuberculosis* (штамм 598, Ib серовар) при однократном введении вызывает накопление провоспалительных цитокинов, TNF-α и IL-6, в сыворотке крови мышей в течение суток после иммунизации [39]. Однако для некоторых бактерий показано, что кроме ЛПС, индукторами синтеза цитокинов могут быть порообразующие белки [40, 41], а в некоторых случаях порины могут снижать интенсивность провоспалительных реакций, индуцированных ЛПС *in vitro* в клетках различных линий [42].

На заключительном этапе эксперимента мы провели иммуногистохимический анализ препаратов головного мозга иммунизированных мышей для выявления IL-2, IL-6 и TNF-α. Мы считаем, что в тканях, полученных через 90, 180 и 280 дней после иммунизации поринами, эти медиаторы воспаления не были обнаружены, поскольку различия между контрольными и опытными образцами были статистически недостоверными.

Однако ранее на примере провоспалительных IL-12 и TNF-α в эксперименте *in vivo* мы охарактеризовали цитокиновый ответ при однократном введении OmpF и OmpC поринов НМ *Y. pseudotuberculosis* в дозе 100 мкг на мышь. В эксперименте использовали препараты изолированных поринов (содержащих менее 3% ЛПС) и поринов, предварительно обработанных полимиксином В (РВ), который инактивирует ЛПС, вызывая необратимое изменение структуры эндотоксина за счёт избирательного связывания с его липидной частью [43]. Использование РВ позволило выявить собственную цитокинстимулирующую активность поринов псевдотуберкулёзного микроба [43]. Было показано, что как изолированные, так и обработанные РВ порины псевдотуберкулёзного микроба практически в одинаковой степени ингибируют синтез TNF-α в течение 24 ч. Следовательно, наряду с другими мембранными

белками иерсиний, такими как Yop-белки [44], неспецифические порины можно отнести к числу факторов вирулентности, подавляющих синтез TNF-α. С другой стороны, было установлено, что оба порина, так же как ЛПС, стимулируют синтез провоспалительного цитокина IL-12. Незначительно отличалась только динамика изменения уровня этого медиатора воспаления в течение суток для изолированных и обработанных РВ белков. Если в присутствии примеси ЛПС максимальный уровень IL-12 наблюдался уже через 2 ч после начала эксперимента, немного снижаясь впоследствии, то в случае поринов, обработанных РВ, количество IL-12 постепенно увеличивалось в течение всего периода наблюдения.

Таким образом, можно сказать, что порины, так же как ЛПС из *Y. pseudotuberculosis*, вызывают синтез некоторых провоспалительных цитокинов только в острой фазе развития инфекционного процесса. На более поздних этапах развития иммунной реакции организма механизм воздействия бактериальных белков на клетки не обязательно связан с синтезом медиаторов воспаления, а может быть обусловлен способностью поринов нарушать целостность мембран эукариотических клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, показано, что при однократной иммунизации мышей неспецифические порины *Y. pseudotuberculosis* могут вызывать частично обратимую дегенерацию клеток в поверхностных слоях коры головного мозга. Дистрофические изменения, которые наблюдаются в тканях головного мозга после иммунизации животных поринами, сильнее выражены в нейронах молекулярной пластинки. В случае OmpF порина эти изменения имеют более ранние сроки инициации по сравнению с таковыми, индуцированными введением OmpC. Характерно наличие признаков репаративного процесса, за счёт которого к концу эксперимента частично восстанавливается количество неповреждённых клеток. Установлено, что увеличение уровня экспрессии каспазы 3 в нейронах иммунизированных животных коррелирует с уменьшением значения показателя удельной плотности клеток. В связи с этим можно говорить о том, что изменения показателя готовности клеток к апоптозу происходят на фоне структурной реорганизации тканей даже при наличии признаков компенсаторно-восстановительной реакции со стороны нейронов.

В настоящее время существует мнение, что любая хроническая персистирующая инфекция может запускать в макроорганизме каскад реакций, результатом которых могут стать в том числе различные нейродегенеративные процессы [45]. Так, недавние исследования Matheoud et al. [46] показали, что экспериментальная инфекция, вызываемая *Citrobacter rodentium*, запускает в организме животных процессы аутоиммунного характера, которые в конечном итоге приводят к образованию специфических для митохондрий цитотоксических CD8⁺ Т-клеток в тканях головного мозга. Помимо этого, у инфицированных мышей наблюдается резкое снижение плотности дофаминергических нейронов и развиваются двигательные нарушения, исчезающие после лечения L-ДОФА. Эти результаты подтверждают предположение о том, что кишечная инфекция может способствовать развитию болезни Паркинсона.

Данные, полученные в нашей работе на мышинной модели, свидетельствуют о том, что неспецифические порообразующие белки грамотрицательной бактерии *Y. pseudotuberculosis*, действуя как триггерные факторы, также могут активировать программу апоптотической гибели нервных клеток. Кроме того, на поздних этапах развития иммунной реакции организма механизм воздействия бактериальных белков на клетки, вероятно, обусловлен спо-

собностью поринов встраиваться в мембраны эукариотических клеток, стимулируя развитие апоптоза. Вследствие этого высокая антигенная нагрузка при хроническом течении псевдотуберкулёза у людей, реализуемая в том числе за счёт поринов НМ, может стать одной из причин развития нейровоспаления и дегенеративных изменений в тканях головного мозга.

Вклад авторов. О.Ю. Портнягина, О.Д. Новикова — концепция и руководство работой; Д.Н. Ивашкевич, И.В. Дюйзен, Л.С. Шевченко, О.Ю. Портнягина — проведение экспериментов; О.Ю. Портнягина, О.Д. Новикова, Д.Н. Ивашкевич, И.В. Дюйзен — обсуждение результатов исследования; О.Ю. Портнягина — написание текста; О.Д. Новикова — редактирование текста статьи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Эксперименты с животными были проведены в соответствии с положениями Директивы 2010/63/ЕС Европейского парламента и Совета Европейского Союза «О защите животных, использующихся для научных целей», и одобрены этическим комитетом ТИБОХ ДВО РАН им. Г.Б. Елякова.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hoogkamp-Korstanje, J. A. (1990) Yersinia infections, *Ned. Tijdschr. Geneeskde*, **140**, 128-130.
2. Сидельникова С. М., Ющенко Г. В., Асеева Э. И. (2000) Иерсиниозы как терапевтическая проблема, *Тер. Архив*, **11**, 27-30.
3. Somova, L. M., Antonenko, F. F., Timchenko, N. F., and Lyapun, I. N. (2020). Far Eastern Scarlet-Like Fever is a special clinical and epidemic manifestation of *Yersinia pseudotuberculosis* infection in Russia, *Pathogens*, **9**, 436, doi: 10.3390/pathogens9060436.
4. Granfors, K., Merilahti-Palo, R., Luukkainen, R., Möttönen, T., Lahesmaa, R., et al. (1998) Persistence of Yersinia antigens in peripheral blood cells from patients with *Yersinia enterocolitica* O:3 infection with or without reactive arthritis, *Arthrit. Rheum.*, **41**, 855-862, doi: 10.1002/1529-0131(199805)41:5<855::AID-ART12>3.0.CO;2-J.
5. Бениова С. Н. (2006) Возможные направления коррекции неблагоприятного течения псевдотуберкулёза у детей, *Тихоокеанский Мед. Журн.*, **4**, 61-63.
6. Каманцев В. Н., Скрипченко Н. В., Тихомирова О. В., Бехтерева М. К. (2003) Поражения периферической нервной системы при иерсиниозной инфекции у детей, *Российский Мед. Журн.*, **2**, 27-29.
7. Sotaniemi, K. A. (1983) Neurologic complications associated with yersiniosis, *Neurology*, **33**, 95-97, doi: 10.1212/WNL.33.1.95.
8. Pulvirenti, D., Aikaterini, T., and Neri, S. (2007) Septicemia, hepatic abscess, and encephalitis due to *Yersinia enterocolitica*, *J. Clin. Gastroenterol.*, **41**, 333-334, doi: 10.1097/01.mcg.0000248011.93267.c5.
9. Kaito, H., Kamei, K., Ogura, M., Kikuchi, E., Hoshino, H., Nakagawa, S., et al. (2012) Acute encephalopathy and tubulointerstitial nephritis associated with *Yersinia pseudotuberculosis*, *Pediatr. Int.*, **54**, 926-928, doi: 10.1111/j.1442-200X.2012.03615.x.
10. Нижегородова Д. Б., Левковская А. Н., Зафранская М. М. (2018) Иммунологические механизмы нейровоспаления и нейродегенерации, *Иммунопатол. Аллергол. Инфектол.*, 2018, **4**, 27-42, doi: 10.14427/jipai.2018.4.27.
11. Chitnis, T., and Weiner, H. L. (2017) CNS inflammation and neurodegeneration, *J. Clin. Invest.*, **127**, 3577-3587, doi: 10.1172/JCI90609.

12. De Chiara, G., Marcocci, M. E., Sgarbanti, R., Civitelli, L., Ripoli, C., et al. (2012) Infectious agents and neurodegeneration, *Mol. Neurobiol.*, **46**, 614-638, doi: 10.1007/s12035-012-8320-7.
13. Patrick, K., Bell, S., Weindel, C., and Watson, R. (2019) Exploring the "Multiple-Hit hypothesis" of neurodegenerative disease: bacterial infection comes up to bat, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **9**, 2235-2988, doi: 10.3389/fcimb.2019.00138.
14. Farnen, K., Tofiño-Vian, M., and Iovino, F. (2021) Neuronal damage and neuroinflammation, a bridge between bacterial meningitis and neurodegenerative diseases, *Front. Cell. Neurosci.*, **15**, 680858, doi: 10.3389/fncel.2021.680858.
15. Brown, G., (2019) The endotoxin hypothesis of neurodegeneration, *J. Neuroinflamm.*, **16**, 180, doi: 10.1186/s12974-019-1564-7.
16. Achouak, W., Heulin, T., and Pagès, J.-M. (2001) Multiple facets of bacterial porins, *FEMS Microbiol. Lett.*, **199**, 1-7, doi: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10642.x.
17. Bernardini, M., Sanna, M., Fontaine, A., and Sansonetti, P. (1993) OmpC is involved in invasion of epithelial cells by *Shigella flexneri*, *Infect. Immun.*, **61**, 3625-3635, doi: 10.1128/iai.61.9.3625-3635.1993.
18. Massari, P., Ram, S., Macleod, H., and Wetzler, L. (2003) The role of porins in neisserial pathogenesis and immunity, *Trends Microbiol.*, **11**, 87-93, doi: 10.1016/S0966-842X(02)00037-9.
19. Hejair, H. M. A., Zhu, Y., Ma, J., Zhang, Y., Pan, Z., et al. (2017) Functional role of OmpF and OmpC porins in pathogenesis of avian pathogenic *Escherichia coli*, *Microb. Pathog.*, **107**, 29-37, doi: 10.1016/j.micpath.2017.02.033.
20. Gupta, S., Prasad, G., and Mukhopadhyaya, A. (2015) *Vibrio cholerae* porin OmpU induces caspase-independent programmed cell death upon translocation to the host cell mitochondria, *J. Biol. Chem.*, **290**, 31051-31068, doi: 10.1074/jbc.M115.670182.
21. Rajan, J. S., Santiago, Ch., Singaravel, R., and Ignacimuth, S. (2016) Outer membrane protein C (OmpC) of *Escherichia coli* induces neurodegeneration in mice by acting as an amyloid, *Biotechnol. Lett.*, **38**, 689-700, doi: 10.1007/s10529-015-2025-8.
22. Вострикова О. П., Новикова О. Д., Дробков В. И., Дармов И. В., Маракулин И. В., Соловьева Т. Ф. (2000) Иммунный ответ к основному порообразующему белку наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* у людей и экспериментальных животных, *ВИНИТИ*, 795-800.
23. Hedstrom, R., Pavlovskis, O., and Galloway, R. (1984) Antibody response of infected mice to outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa*, *Infect. Immun.*, **41**, 49-53, doi: 10.1128/iai.43.1.49-53.1984.
24. Kuusi, M., Nunninen, M., Saxon, H., Valtoneri, M., and Makela, P. H. (1979) Immunization with major outer membrane proteins in experimental salmonellosis in mice, *Infect. Immun.*, **25**, 857-862, doi: 10.1128/iai.25.3.857-862.1979.
25. Дармов И. В., Маракулин И. В., Погорельский И. П., Новикова О. Д., Портнягина О. Ю., Соловьева Т. Ф. (1999) Профилактика экспериментальной псевдотуберкулезной инфекции с помощью иммунизации порином из *Yersinia pseudotuberculosis*, *Бюл. Эксп. Биол. Мед.*, **127**, 221-223.
26. Портнягина О. Ю., Новикова О. Д., Вострикова О. П., Соловьева Т. Ф. (1999) Динамика иммунного ответа к порину из наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis*, *Журн. Микробиол. Эпидемиол. Иммунобиол.*, **128**, 437-440.
27. Супотницкий М. В. (1997) Эффективное патентование средств специфической профилактики инфекционных заболеваний, *Биотехнология*, **9-10**, 56-79.
28. Cartwright, K., Morris, P., Rumke, H., Fox, R., Borrow, R., et al. (1999) Immunogenicity and reactogenicity in UK infants of a novel meningococcal vesicle vaccine containing multiple class 1 (PorA) outer membrane proteins, *Vaccine*, **17**, 2612-2619, doi: 10.1016/S0264-410X(99)00044-4.
29. Hassett, D., and Whitton, J. (1996) DNA immunization, *Trends Microbiol.*, **4**, 307-312, doi: 10.1016/0966-842X(96)10048-2.
30. Lu, Y.-S., Gerrity, L., Afendis, S., Walkins, L., and Pakes, S. (1988) Distribution of a monoclonal antibody-recognized protective protein immunogen on the outer membranes of *Pasteurella multocida* rabbit isolates, *J. Clin. Microbiol.*, **26**, 1326-1330, doi: 10.1128/jcm.26.7.1326-1330.1988.
31. Lutwiche, P., Exner, M., Hancock, R., and Trust, T. (1995) A conserved *Aeromonas*-porin provides protective immunity to rainbow-trout, *Infect. Immun.*, **63**, 3137-3142, doi: 10.1128/iai.63.8.3137-3142.1995.
32. Новикова О. Д., Хоменко В. А., Емельяненко В. И., Лихацкая Г. Н., Зелепуга Е. А., Ким Н. Ю., и др. (2011) OmpC-подобный порин из *Yersinia pseudotuberculosis*: молекулярная характеристика, физико-химические и функциональные свойства, *Биол. Мембр.*, **28**, 1-16.
33. Portnyagina, O., Zelepuga, E., Khomenko, V., Solov'eva, E., Solov'eva, T., and Novikova, O. (2018) In silico and in vitro analysis of cross-reactivity between *Yersinia pseudotuberculosis* OmpF porin and thyroid-stimulating hormone receptor, *Int. J. Biol. Macromol.*, **107**, 2484-2491, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.133.
34. Skaper, S. D., Facci, L., and Zusso, M. (2018) An inflammation-centric view of neurological disease: beyond the neuron, *Front. Cell. Neurosci.*, **12**, 72, doi: 10.3389/fncel.2018.00072.
35. Müller, A., Günther, D., Dux, F., Naumann, M., Meyer, T. F., and Rudel, T. (1999) Neisserial porin (PorB) causes rapid calcium influx in target cells and induces apoptosis by the activation of cysteine proteases, *EMBO J.*, **18**, 339-352, doi:10.1093/emboj/18.2.339.

36. Никифоров В. А., Кичикова В. В., Ефимов Е. И. (2011) Актуальные и нерешенные проблемы менингококковой инфекции на современном этапе, *Мед. Альманах*, **4**, 94-99.
37. Mattson, M. P. (2000) Apoptosis in neurodegenerative disorders, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **1**, 120-129, doi: 10.1038/35040009.
38. Volles, M. J., and Lansbury P. T., Jr. (2003) Zeroing in on the pathogenic form of alpha-synuclein and its mechanism of neurotoxicity in Parkinson's disease, *Biochemistry*, **42**, 7871-7878, doi: 10.1021/bi030086j.
39. Kuznetsova, T. A., Besednova, N. N., Somova, L. M., and Plekhova, N. G. (2014) Fucoidan extracted from *Fucus evanescens* prevents endotoxin-induced damage in a mouse model of endotoxemia, *Mar. Drugs*, **12**, 886-898, doi: 10.3390/md12020886.
40. Galdiero, M., Cipollaro de L'ero, G., Donnarumma, G., Marcatili, A., and Galdiero, F. (1995) Interleukin-1 and interleukin-6 gene expression in human monocytes stimulated with *Salmonella typhimurium* porins, *Immunology*, **86**, 612-619.
41. Galdiero, M., D'Amico, M., Gorga, F., Di Filippo, C., D'Isanto, M., Vitiello, M., et al. (2001) *Haemophilus influenzae* porin contributes to signaling of the inflammatory cascade in rat brain, *Infect. Immun.*, **69**, 221-227, doi: 10.1128/IAI.69.1.221-227.2001.
42. Sakharwade, S. C., and Mukhopadhyaya, A. (2015) *Vibrio cholerae* porin OmpU induces LPS tolerance by attenuating TLR-mediated signaling, *Mol. Immunol.*, **68**, 312-324, doi: 10.1016/j.molimm.2015.09.021.
43. Портнягина О. Ю., Родина Э. Е., Новикова О. Д. (2019) Неспецифические порины *Yersinia pseudotuberculosis*, как индукторы синтеза цитокинов, *Конференция, посвященная 55-летию ТИБОХ ДВО РАН и 90-летию со дня рождения его основателя академика Г. Б. Елякова, ТИБОХ ДВО РАН*, Владивосток, 11-15 сент. 2019 г.: материалы конференции, с. 95, EDN: RKZMVN.
44. Ruckdeschel, K. (2002) Immunomodulation of macrophages by pathogenic *Yersinia* species, *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, **50**, 131-137.
45. Tohidpour, A., Morgun, A. V., Boitsova, E. B., Malinovskaya, N. A., Martynova, G. P., Khilazheva E. D., et al. (2017) Neuroinflammation and infection: molecular mechanisms associated with dysfunction of neurovascular unit, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **7**, 276, doi: 10.3389/fcimb.2017.00276.
46. Matheoud, D., Cannon, T., Voisin, A., Penttinen, A. M., Ramet, L., Fahmy, A. M., et al. (2019) Intestinal infection triggers Parkinson's disease-like symptoms in *Pink1*^{-/-} mice, *Nature*, **571**, 565-569, doi: 10.1038/s41586-019-1405-y.

NON-SPECIFIC PORINS FROM THE OUTER MEMBRANE OF *Yersinia pseudotuberculosis* EFFECT ON MICE BRAIN CORTEX TISSUES

O. Yu. Portnyagina^{1*}, D. N. Ivashkevich², I. V. Duizen², L. S. Shevchenko¹, and O. D. Novikova¹

¹ G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, 690021 Vladivostok, Russia

² A. V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, 690041 Vladivostok, Russia; e-mail: odd64@mail.ru

It was found that with a single immunization of OmpF and OmpC mice with *Yersinia pseudotuberculosis* porins, against the background of an increasing titer of specific antibodies, pathological changes develop in the deep layers of the cerebral cortex, characterized by dystrophic changes in cells. At the same time, an increased level of caspase 3 expression is observed in neurons, which indicates the induction of proapoptotic signaling pathways. The results obtained indicate the potential ability of nonspecific pore-forming proteins of the outer membrane of Gram-negative bacteria to initiate the development of degenerative changes in brain cells.

Keywords: *Yersinia pseudotuberculosis*, OmpF, OmpC porins, neurodegeneration, caspase 3, apoptosis