

Иммунотропные и иммуногенные свойства неспецифических поринов иерсиний

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

УДК 579.842.23:577.112'314.6

<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2019-3-4-350-372>О.Д. Новикова¹, О.Ю. Портнягина¹, О.П. Вострикова¹, В.А. Иванис²

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН (ТИБОХ ДВО РАН), Проспект 100 лет Владивостоку, д. 159, г. Владивосток, 690022, Российская федерация

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России), Проспект Острякова, д. 2, г. Владивосток, 690002, Российская Федерация

Поступила 01.10.2019. Принята к публикации 17.10.2019 г.

Цель исследования – обобщение собственных данных и данных литературы по значению неспецифических порообразующих белков наружной мембраны (поринов) иерсиний как факторов патогенности, диагностических и протективных антигенов, и их роли в патологических процессах, считающихся неинфекционными. В последние десятилетия прошлого века значительно увеличилась эпидемическая значимость кишечных иерсиниозов, вызываемых бактериями *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia enterocolitica* из рода *Yersinia*, являющихся по генетическим, культурально-биохимическим и другим свойствам «двойниками» возбудителя чумы (*Yersinia pestis*). Установлено, что острые иерсиниозные инфекции без эффективного лечения могут переходить во вторично-очаговые формы, приводящие к развитию системных заболеваний, ранее инфекционными не считавшимися (например, болезнь Грейвса). Для них характерны полиорганность поражений, нарушения функции сердечно-сосудистой и нервной систем, опорно-двигательного аппарата, мочевыделительной системы и желудочно-кишечного тракта, что является следствием аутоиммунных процессов, основанных на способности иерсиний к молекулярной мимикрии. В работе так же показано, что порины – это созданные природой наномеханизмы, играющие ключевую роль в развитии инфекционного процесса. Их можно рассматривать как факторы патогенности рода *Yersinia* и других грамотрицательных бактерий. Они обеспечивают адгезию, инвазию и колонизацию бактериями клеток организма-хозяина. Порины влияют на ряд функций эукариотических клеток, включая экспрессию цитокинов, активацию рецепторов, индукцию апоптоза и регуляцию деятельности актинового цитоскелета. Установлено, что порообразующие белки являются видоспецифическими протективными антигенами грамотрицательных бактерий, индуцирующие иммунный ответ, защищающий от ингаляционного заражения, что позволяет их рекомендовать в качестве компонентов химических и генно-инженерных вакцин. Порины перспективны для разработки ИФА тест-систем для диагностики псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза, а также иммунопатологий, обусловленных иерсиниями. Учитывая высокую степень подобия первичных структур поринов иерсиний, можно предполагать, что протективные препараты, созданные на их основе, будут защищать одновременно от инфекций, вызываемых возбудителями кишечного иерсиниоза, псевдотуберкулеза и чумы.

Ключевые слова: болезнь Грейвса; диагностический антиген; иммунотропные свойства; кишечный иерсиниоз; молекулярная мимикрия; наномеханизмы; порины иерсиний; протективный антиген; псевдотуберкулез; рекомбинантные порины; тиреотоксикоз; химическая вакцина; чума.

Библиографическое описание: Новикова О.Д., Портнягина О.Ю., Вострикова О.П., Иванис В.А. Иммунотропные и иммуногенные свойства неспецифических поринов иерсиний // Вестник войск РХБ защиты. 2019. Т. 3. № 4. С. 350-378. <https://doi.org/10.35825/2587-5728-2019-3-4-350-372>

Успехи, достигнутые в глобальной борьбе с инфекционными болезнями, не уменьшили их значимость в общей патологии населения [1–3]. В структуре причин смертности в мире они по-прежнему занимают 3-е место, уступая лишь болезням органов кровообращения и онкологическим заболеваниям [4]. Экономический ущерб, наносимый инфекционными болезнями Российской Федерации, составляет свыше 18 млрд. рублей в год, что наряду с риском возникновения чрезвычайных ситуаций вследствие стихийных бедствий и техногенных катастроф, а также актов биологической агрессии угрожает безопасности России.

По данным Федерального центра Госсанэпиднадзора в Российской Федерации в 1991–1996 гг. ежегодно регистрировалось около 1 млн заболеваний кишечными инфекциями [5]. Возрастающая актуальность проблемы особо опасных инфекционных болезней в современных условиях обусловлена и неуклонной тенденцией появления новых и возвращения старых нозологических форм [6]. Так, к концу двадцатого столетия в стране по не совсем понятным причинам в два раза возросла заболеваемость острыми кишечными диарейными инфекциями нехарактерной этиологии [7]. Среди последних значимую роль играют кишечные иерсиниозы, вызванные бактериями рода *Yersinia* (*Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia enterocolitica*), по генетическим, культурально-биохимическим и другим свойствам являющимися «двойниками» возбудителя чумы (*Yersinia pestis*). Кроме того, все больше появляется фактов, говорящих о том, что в основе тех болезней, которые мы привыкли считать соматическими, лежит хронический инфекционный процесс [8].

Цель исследования – обобщение собственных данных и данных литературы по значению порообразующих белков наружной мембраны иерсиний как факторов их патогенности и как диагностических и протективных антигенов, и их роли в патологических процессах, считающихся неинфекционными.

Иерсиниозы и особенности их патогенеза. Дальневосточный регион занимает одно из первых мест в Российской Федерации (РФ) по наличию стойких природных очагов особо опасных инфекций [9]. При этом возбудители псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза имеют особую эпидемиологическую значимость на территории Приморского края [10].

В соответствии с Международной классификацией болезней (МКБ-10) иерсиниозы регистрируются как 1) энтерит, вызываемый *Y. enterocolitica* (A04.6), и 2) экстраинтестинальный иерсиниоз, или псевдотуберкулез (A28.2), вызываемый *Y. pseudotuberculosis* (рисунок 1).

В естественных экосистемах резервуаром иерсиний является почва и почвенные простейшие. Иерсинии устойчивы к действию низких температур, и не только длительно сохраняют жизнеспособность при отрицательных температурах, но и усиливают свой патогенетический потенциал. Резервуаром иерсиний, из которого заражаются люди, являются грызуны (мыши и крысы), дикие и домашние животные (свиньи, зайцы и кролики, морские свинки, кошки и собаки) [11].

Возбудитель псевдотуберкулеза (*Yersinia pseudotuberculosis*) открыт в 1883 г. французскими бактериологами Р. Малассе (R. Malassez) и В. Виньялем (W. Vignal). Его так и называли – бацилла Малассе-Виньяля

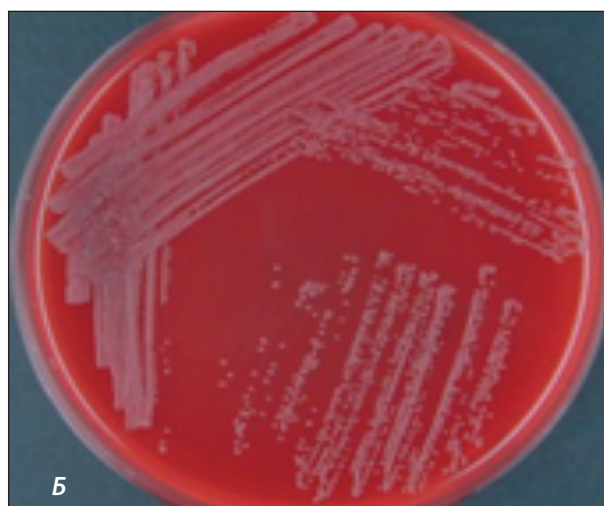


Рисунок 1 – Бактерии *Y. pseudotuberculosis*

(А – электронная фотография (фотография с ресурса <https://www.pnas.org/content/108/4.cover-expansion>; дата обращения: 10.08.2019); Б – колонии *Y. pseudotuberculosis* (фотография с ресурса <https://alchetron.com/Yersinia-pseudotuberculosis>; дата обращения: 10.08.2019)

(фр. Le bacille de Malassez et Vignal). Возбудитель кишечного иерсиниоза (*Y. enterocolitica*) открыт в 1939 г. Д. Шляйфстейном (D. Schleistein) и М. Колеманом (M. Coleman). Своё родовое название бактерии получили в честь швейцарского бактериолога А. Иерсена (A. Yersin), открывшего возбудителя чумы (1894). Все упомянутые бактерии вошли в состав рода *Yersinia* семейства *Enterobacteriaceae* постановлением Международного комитета по систематике бактерий (1972). Первые случаи псевдотуберкулёза у человека в виде абсцедирующих мезаденитов¹ описали В. Массхоф (W. Masshof) и В. Кнапп (W. Knapp) (1953). В 1959 г. на Дальнем Востоке СССР наблюдали эпидемию псевдотуберкулёза, получившего в то время название дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки. Позднее, в 1955 г. В.А. Знаменский и А.К. Вишняков из фекалий больных дальневосточной скарлатиноподобной лихорадкой выделили палочки псевдотуберкулёза (1965). Этиологическую роль возбудителя в возникновении дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки доказал В.А. Знаменский в опыте по самозаражению. Первые заболевания людей, вызванные *Y. enterocolitica*, зарегистрированы в 1962–1963 гг. во Франции, Бельгии, а также Швеции и других скандинавских странах.

До середины XX в. на Дальнем Востоке псевдотуберкулез регистрировался относительно редко, чего не скажешь о вспышках чумы. В дальнейшем на Дальнем Востоке стали возникать крупные эпидемические вспышки «дальневосточной скарлатиноподобной лихорадкой» [12], но чума утратила свою эпидемическую значимость. В настоящее время на Дальнем Востоке псевдотуберкулез повсеместно наблюдается в виде спорадических случаев и ограниченных эпидемических вспышек.

Иерсиниозы отличаются от других острых кишечных инфекций полиморфизмом проявления клинических признаков, поэтому их достоверная клиническая диагностика сложна. Бактериологический посев различных биологических материалов считается «золотым стандартом» микробиологической диагностики, однако энтеропатогенные иерсинии сложно отличить от других кишечных микроорганизмов по культурально-морфологическим и биохимическим признакам. Проблема усугубляется и недостаточной специфичностью коммерческих тест-систем, доступных в настоящее время практическому здравоохранению, что затрудняет верификацию забо-

левания и, как следствие, своевременное и эффективное проведение лечебных мероприятий [13].

В настоящее время острые кишечные инфекции, вызываемые патогенными для человека иерсиниями (*Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*) вышли за рамки инфекционной патологии и стали терапевтической проблемой [14]. Это связано с развитием так называемых вторично-очаговых форм этих заболеваний, которые не являются самостоятельными, а могут стать следствием любой из описанных форм иерсиниозов (рисунок 2).

Вторично-очаговые формы иерсиниозов проявляются у людей рецидивирующими и хроническими формами течения болезни и часто сопровождаются развитием системных заболеваний. Последние отличаются полиорганностью поражений и сопровождаются нарушениями функции сердечно-сосудистой и нервной систем, опорно-двигательного аппарата, мочевыделительной системы и желудочно-кишечного тракта [15]. Системные патологические процессы, развивающиеся после иерсиниозной инфекции, рассматриваются как аутоиммунные, поскольку в основе их лежит способность иерсиний к молекулярной мимикрии [16]. Решающую роль в определении характера течения и исходов иерсиниозов играют нарушения специфической и неспецифической защиты макроорганизма. Характерными признаками дезорганизации иммунных процессов при псевдотуберкулезе являются: нарушения клеточного, гуморального и цитокинового звеньев иммунитета [17–19].

Иммуногенез вторичных иммунодефицитов, обусловленных иерсиниями, до сих пор плохо изучен. Методы достоверной диагностики вторично-очаговых форм иерсиниозов в настоящее время отсутствуют, соответственно больному не может быть назначена этиотропная терапия. В этой связи ранняя верификация вторичных иммунодефицитов, причиной развития которых является иерсиниоз/псевдотуберкулез, на основании результатов клинико-лабораторного и иммунологического обследований, а также анализ данных анамнеза текущего заболевания приобретают особую значимость.

Структура и свойства неспецифических поринов наружной мембраны грамотрицательных бактерий. Основными (general) белками наружной мембраны (НМ) грамотрицательных бактерий и вторыми по значимости после липополисахарида (ЛПС) антигенами, определяющими иммунный ответ хозяина на эти бактерии, являются неспецифические (nonspecific)

¹ Мезаденит (лимфаденит мезентериальный) – воспаление лимфоузлов, расположенных в складке брюшины, основной функцией которой является подвешивание и прикрепление тонкого кишечника к задней стенке живота.

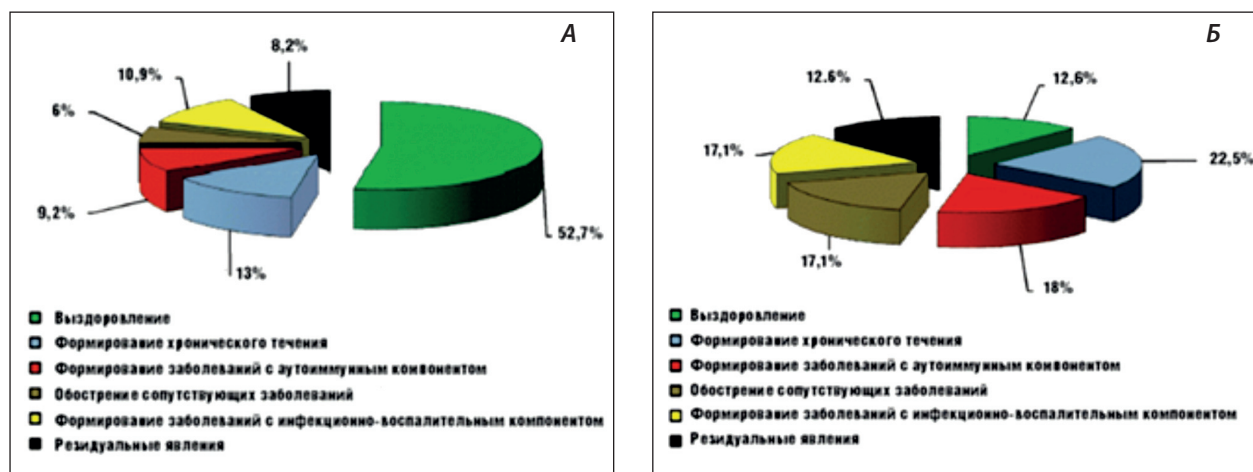


Рисунок 2 – Отдаленные исходы смешанной (А) и вторично-очаговой (Б) форм псевдотуберкулезной инфекции (изображение с ресурса <https://www.lvrach.ru/2009/11/11184197/>; дата обращения: 10.08.2019)

порообразующие белки². Каналы, образованные поринами, обеспечивают обмен низкомолекулярными гидрофильными веществами между бактериальной клеткой и окружающей средой.

Структурным элементом поринов является эллипсообразный в сечении β -складчатый цилиндр (баррель), состоящий из антипараллельных β -тяжей (или стрэндов), соединенных так называемыми петлями, участками полипептидной цепи белка с неупорядоченной и/или α -спиральной структурой. В нативной мембране неспецифические порины существуют в виде тримеров, в стабилизации пространственной структуры которых помимо гидрофобных взаимодействий существенную роль играют водородные и ионные связи. Этим объясняется необычайная устойчивость этих белков по отношению к протеазам, повышенной температуре и другим денатурирующим факторам. Водонаполненные каналы, образуемые поринами, образуют трансмембранную систему, проницаемую для гидрофильных молекул с молекулярной массой не более 600 дальтон (Да). И это не статические постоянно открытые каналы, а более сложные комплексы с динамическим поведением, состояние которых напрямую зависит от условий окружающей среды. Таким образом, порины выполняют в клетке основополагающую функцию, обеспечивающую жизнедеятельность бактерий [20].

С другой стороны, благодаря тому, что неупорядоченные (или α -спирализованные) элементы структуры поринов, соединяющие β -тяжи, выходят на поверхность бактериальной клетки, они играют заметную роль в развитии инфекционного процесса. В этом качестве они

выступают как эффекторы патогенеза, подавляя отдельные стадии иммунной защиты хозяина и обеспечивая выживание патогенного микроорганизма в его организме. В то же время, порины представляют собой молекулы-мишени для системы врожденного иммунитета хозяина. Они активируют факторы немедленной защиты макроорганизма и включаются в формирование специфического иммунного ответа [21].

На сегодняшний день не существует единого мнения о том, какой тип антигенных (АГ) детерминант, характерных для белковых молекул, наиболее часто встречается у порообразующих белков. Тем не менее, существование у поринов двух типов АГ детерминант подтверждается в экспериментах многих исследователей: *линейных*, обусловленных аминокислотной (АК) последовательностью белка, и *конформационных* (прерывистых, или составных), формирующихся на более высоких уровнях структурной организации белковой молекулы. Некоторые авторы считают, что большая часть АГ детерминант поринов является «прерывистыми» и приходится преимущественно на участки наружных петель. Основные различия, возникшие в аминокислотной последовательности поринов в результате эволюции, локализованы преимущественно во внешних петлях [22].

Поэтому, идентификация поверхностных и трансмембранных АГ эпитопов поринов чрезвычайно важна. В зависимости от того, каким участкам аминокислотной последовательности поринов соответствуют синтетические пептиды, они могут быть использованы для целей диагностики, вакцинопрофилактики или структурно-функциональных исследований. Напри-

² Белки наружной бактериальной мембраны, предназначенные для пассивной диффузии гидрофильных молекул с молекулярной массой не более 600 Да и не имеющие специфических сайтов связывания с диффундирующими через пору лигандами.

мер, участки, соответствующие консервативным эпитопам могут быть использованы для создания вакцин, защищающих от родственных инфекций, в то время как *вариабельные участки* могут обеспечивать видо- и штаммоспецифическую защиту.

Неспецифические порины наружной мембраны грамотрицательных бактерий относятся к высокоиммуногенным антигенам, и иммунный ответ на них имеет ряд особенностей. *Во-первых*, высокий уровень антител к поринам ряда грамотрицательных бактерий обнаруживается у людей как при естественном течении инфекции, так и при вакцинации. *Во-вторых*, наблюдается длительная продолжительность циркуляции специфических антител в крови животных, как в результате иммунизации, так и при развитии заболевания, то есть иммунная система реагирует формированием В- и Т-клеток памяти в ответ на контакт с пориновыми белками грамотрицательных бактерий. Антитела к поринам обнаруживаются в сыворотках крови экспериментальных животных (мышей, кроликов, крыс, обезьян) вне зависимости от формы вводимого антигена: при иммунизации целыми клетками, фрагментами клеточной стенки бактерий, изолированными белками [21]. Эти два обстоятельства также должны приниматься разработчиками химических и генно-инженерных вакцин при выборе перспективных антигенов.

На современном этапе развития иммунологии и вакцинопрофилактики основным критерием при выборе антигена для вакцинации стало обеспечение возможности получения видоспецифического иммунитета, а также эффективной защиты от аэрогенного (ингаляционного) инфицирования [23]. Как правило, выбор антигенов для вакцин ограничен отдельными поверхностными белками микроорганизмов. В связи с вышесказанным, наибольший интерес представляют комбинированные вакцины, включающие основные иммунодоминантные эпитопы антигенов различных возбудителей, иммобилизованные на единой матрице. В качестве платформы, в частности, могут быть использованы порины НМ грамотрицательных бактерий. Создание химерных белков, включающих модельные (маркерные) пептиды и изучение их иммунохимических свойств послужит основой для разработки подходов к созданию высокоэффективных и специфичных препаратов нового поколения для диагностики и профилактики заболеваний, в том числе обусловленных иерсиниями.

Порины, в качестве антигенных компонентов вакцин, имеют значительные преимущества по сравнению с липополисахаридами (ЛПС), индуцирующего штаммоспецифический им-

мунитет. *Во-первых*, порины менее токсичны, *во-вторых*, как правило, они являются видоспецифическими антигенами, поэтому могут защищать от инфекции, вызываемой всеми серотипами данного вида микроорганизма.

Порины могут рассматриваться как факторы патогенности бактерий. Совместно с другими компонентами НМ они обеспечивают адгезию, инвазию и колонизацию бактериями клеток организма-хозяина. Порины могут влиять на ряд функций нормальных эукариотических клеток, включая экспрессию цитокинов, активацию рецепторов, индукцию апоптоза и регуляцию деятельности актинового цитоскелета [22].

Структура и функция поринов иерсиний.

Главным объектом наших исследований стал один из неспецифических порообразующих белков, OmpF порин из НМ псевдотуберкулезного микроба *Y. pseudotuberculosis*. Кроме того, был также выделен и охарактеризован ряд белков из патогенных и непатогенных для человека видов иерсиний, в частности из НМ *Y. enterocolitica* и несколько поринов из группы так называемых энтероколитокоподобных видов иерсиний (*Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. frederiksenii*) [26] и порин из *Y. ruckeri* [27], являющейся патогеном для рыб, а также порины другого типа (OmpC) из НМ *Y. pseudotuberculosis* [28] и *Y. enterocolitica* [29]. Все выделенные белки отличались большим содержанием суммарной β -структуры (60–80 %) и высокой степенью пластичности на уровне третичной структуры белка [26, 27, 30, 31].

Изученные порины являются термозависимыми белками. В диапазоне температур 50–70 °C они претерпевают необратимый конформационный переход, сопровождающийся диссоциацией тримеров на мономеры. OmpF порины энтероколитокоподобных видов иерсиний оказались менее устойчивыми по отношению к температуре по сравнению с порином из псевдотуберкулезного микроба [26]. Необычно термоустойчивый OmpF порин был выделен из *Y. ruckeri*, температура его необратимого термоперехода была на 20 °C выше таковой, наблюдаемой для OmpF белков иерсиний и других энтеробактерий [32].

Порообразующие свойства поринов иерсиний были исследованы с помощью техники бислойных липидных мембран (БЛМ). Каналы, образуемые поринами патогенных видов иерсиний в искусственной мембране, были, как правило, однородны. Величины их наиболее вероятных уровней проводимости составляли 180–240 пСм³. В случае поринов непатогенных видов иерсиний наблюдался значительно больший разброс этих величин (от 180 до 400 пСм), что, вероятно, вызвано большим разнообразием условий обитания

³ пСм – пикосименс (10^{-12} См, сименса – единицы измерения электрической проводимости).

Таблица 1 – Аминокислотный состав OmpF-подобных поринов рода *Yersinia*

Название АК остатка	Фактическое и процентное содержание аминокислотных остатков (в расчете на мономер порина)					
	<i>Y. pseudotuberculosis</i>		<i>Y. pestis</i>		<i>Y. enterocolitica</i>	
Ala (A)	24	7,10	26	7,69	24	6,72
Arg (R)	11	3,25	10	2,69	12	3,36
Asn (N)	33	9,76	34	10,06	35	9,80
Asp (D)	32	9,47	32	9,47	34	9,52
Cys (C)	0	0	0	0	0	0
Glu (E)	11	3,25	12	3,55	12	3,36
Gln (Q)	15	4,44	15	4,44	19	5,32
Gly (G)	38	11,24	39	11,54	43	12,04
His (H)	2	0,59	2	0,59	2	0,56
Ile (I)	12	3,55	13	3,85	10	2,80
Leu (L)	21	6,21	22	6,51	23	6,44
Lys (K)	19	5,62	18	5,33	18	5,04
Met (M)	6	1,78	4	1,18	5	1,40
Phe (F)	22	6,51	21	6,21	19	5,32
Pro (P)	3	0,89	3	0,89	3	0,84
Ser (S)	19	5,62	20	5,92	3	0,84
Thr (T)	20	5,92	20	5,92	25	7,00
Trp (W)	3	0,89	3	0,89	3	0,84
Tyr (Y)	26	7,69	25	7,40	27	7,56
Val (V)	21	6,21	19	5,62	22	6,16
Заряженные	188		188		205	
Незаряженные	150		150		152	
M (Да)	37724,4		37424,9		39507,3	
Общее число АК остатков	338		338		357	

этих микроорганизмов в окружающей среде [26]. Потенциал закрытия порина из *Y. ruckeri* имеет аномально высокую величину по сравнению с таковой классического порина из *E. coli* [33].

В последнее время появились работы о влиянии липидного состава мембраны на структуру и свойства ее компонентов, в том числе поринов [34–36]. Исследования с использованием штаммов *E. coli* с регулируемым составом мембранных липидов в сочетании с методами определения топологии белка показали, что липидные молекулы – важнейший фактор, определяющий ориентацию трансмембранного домена белка по отношению к плоскости бислойа [37]. *Y. pseudotuberculosis* может изменять свой липидный профиль в зависимости от температуры, способа культивирования, фазы роста и источника углерода [38, 39]. Такие различия в термозависимости, ориентации трансмембранного домена, потенциала закрытия, открывает пориновым белкам дорогу для использования в качестве наномеханизмов различного назначения.

Анализ аминокислотных последовательностей OmpF поринов патогенных видов бактерий рода *Yersinia*. При множественном вы-

равнивании АК последовательностей зрелых OmpF-подобных белков патогенных иерсиний были обнаружены следующие закономерности. Во-первых, наблюдается наличие протяженных областей высокой и низкой гомологии, при этом консервативные участки приходятся на трансмембранные домены, а высоковариабельными участками, подобно OmpF *E. coli*, являются «внешние» петли. Во-вторых, выявлена очевидная закономерность в распределении гидрофобных аминокислот и консервативных АК остатков, в первую очередь, глициновых, тирозиновых и фенилаланиновых (вышеупомянутые АК остатки выделены в таблице 1 жирным шрифтом). Образование двух так называемых «ароматических поясов» – структурная особенность пориновых белков. Одна из этих «ароматических гирлянд» находится на границе мембраны и периплазматического пространства, а вторая – на границе мембраны и внеклеточного пространства. Их функция заключается в удержании гомотримера⁴ в липидном слое мембраны.

Результаты сравнительного анализа АК последовательностей OmpF-подобных пори-

⁴ Гомотример – тример из одинаковых белковых мономеров.

Таблица 2 – Гомология АК последовательностей OmpF поринов из *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis* (в %)

Название АК остатка	<i>Y. pseudotuberculosis</i>		<i>Y. pestis</i>	
	Yps_3260 (1B)	Yps_32953 (1B)	Yp_C092 Yp_KIM (orientalis)	Yp_91001 (mediaevalis)
Yps_3260	100	98,6	95,0	94,8
Yps_32953	-	100	93,6	93,4
Yp_C092	-	-	100	99,2
Yp_91001	-	-	-	100

Примечание:

Y. pestis (Yp_91001, Yp_C092, Yp_KIM), *Y. pseudotuberculosis* (Yps_3260, Yps_32953).

Жирным шрифтом выделены наибольшие значения степени гомологии проанализированных АК последовательностей.

Таблица 3 – Гомология АК последовательностей OmpF поринов *Y. enterocolitica* и других энтероколитикоподобных видов иерсиний (в %)

Штамм	<i>Y. enterocolitica</i>		<i>Y. ntermedia</i>	<i>Y. kristensenii</i>	<i>Y. frederiksenii</i>
	Ye_164	Ye_8081	Yi_253	Yk_991	Yf_4849
Ye_164	100	93,2	84,1	84,5	85,7
Ye_8081	-	100	80,6	82,1	82,4
Yi_253	-	-	100	88,3	84,6
Yk_991	-	-	-	100	84,6
Yf_4849	-	-	-	-	100

Примечание:

Y. enterocolitica (Ye_164, Ye_8081); *Y. intermedia* (Yi_253); *Y. kristensenii* (Yk_991) *Y. frederiksenii* (Yf_4849).

нов иерсиний, в том числе взятых из GeneBank (NCBI), представлены в виде таблиц, отдельно для поринов из *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis* (таблица 2) и для поринов из *Y. enterocolitica* и других энтероколитикоподобных видов иерсиний (таблица 3).

При сравнении поринов второй группы бактерий (таблица 3) было обнаружено, что высокая степень гомологии первичной структуры белков наблюдалась для поринов из разных штаммов *Y. enterocolitica* (93,2 %). Для представителей других видов энтероколитикоподобных иерсиний процент гомологии АК последовательности исследуемых белков составил 80,6–88,3 %, что укладывается в допустимый интервал значений межвидового подобия.

Как видно из таблиц 2 и 3, наиболее близкими видами по аминокислотному составу OmpF-подобных поринов между собой являются *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis*. Степень гомологии внутри вида составляет 98,8–100 % для серотипов *Y. pseudotuberculosis* и 99,2–100 % для сероваров *Y. pestis*. Эти данные свидетельствуют о близком эволюционном родстве этих двух видов иерсиний и подтверждают гипотезу появления *Y. pestis* в результате мутаций *Y. pseudotuberculosis* [40].

Теоретическая модель пространственной структуры поринов иерсиний. Среди белковых

структур, представленных в банках данных, структуры мембранных белков составляют лишь малую часть, менее 1 % [41]. Однако, именно эти белки играют чрезвычайно важную роль в самых разнообразных биологических процессах, в том числе и проявлении вирулентности бактерий и протективных свойства вакцин. На основании высокой степени гомологии АК последовательностей между OmpF порином *E. coli* и поринами патогенных видов иерсиний (56–61 %), а также с учетом практически полной идентичности первичной структуры OmpF порина из *Y. pseudotuberculosis* и порина из *Y. pestis*, для поринов патогенных видов иерсиний (*Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*) методом гомологичного моделирования с использованием Swiss-PDB Viewer 3.7 (SPD-BV) и Swiss-Mode Server (www.expasy.org/spdbv/; www.expasy.org/swissmod/) были построены модели пространственной структуры мономеров (1HXX) (рисунок 3А и 3Б). В качестве прототипа для мономеров была использована 3-D структура порина Pho E из *E. coli*. Модель тримера OmpF *Y. pseudotuberculosis* (рисунок 3А) была построена с использованием в качестве матрицы пространственной структуры тримера порина OmpF *E. coli* (3HXX).

Обнаружено, что порины иерсиний по пространственной организации их молекул очень похожи на таковую неспецифических поринов других энтеробактерий. Они имеют те же самые

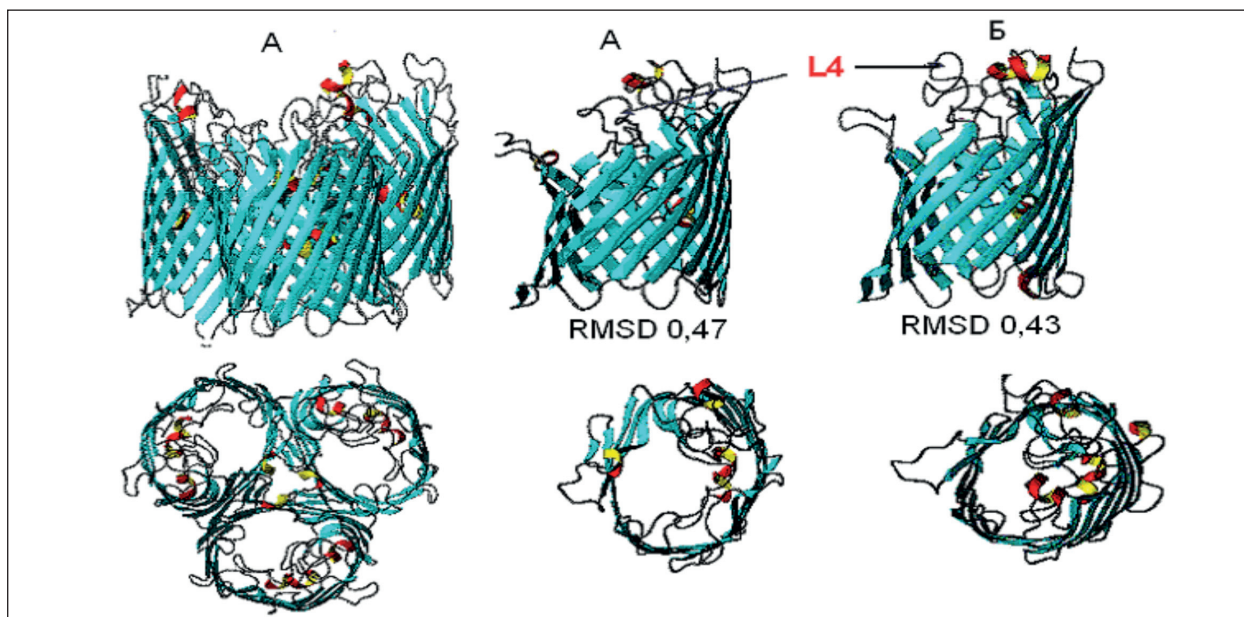


Рисунок 3 – Теоретическая модель пространственной структуры тримера порина из *Y. pseudotuberculosis* (А) и *Y. enterocolitica* (Б). (Данные авторов)

особенности структуры: как в общей укладке β -тяжей, так и в расположении петель, в частности, функционально значимой петли L3 и петли L2, которая направлена в сторону от «своего» мономера, частично закрывая вход в пору соседнего мономера. [42]. Самая длинная петля L3, в отличие от остальных, выходящих за пределы барреля, погружена в полость поры до середины, ограничивая, тем самым, ее размер и образуя сужение, так называемую «зону констрикции, или «глазок поры». Заряженные остатки, локализованные в области «глазка», значительно влияют на ионоселективность и проницаемость канала. Взаимодействия АК остатков петли L2 с таковыми, локализованными в основании петли L3 соседнего мономера, обеспечивают высокую стабильность тримерной структуры порина.

Верификация острых форм иерсиниозов с помощью ИФА тест-системы на основе поринов иерсиний. Диагностика острых кишечных инфекций, обусловленных иерсиниями, характеризуется низкой эффективностью средств и способов их верификации. Только комплексная клинико-лабораторная диагностика с использованием специфических методов позволяет установить истинную природу болезни. Авторами были разработаны и успешно апробированы две ИФА тест-системы на основе поринов из *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* для определения уровня антител в сыворотках больных [43–45]. Эффективность разработанных тест-систем оказалась почти в два раза выше таковой реакции непрямой геммагглютинации (РНГА) на основе коммерческого типоспецифического диагностикума. Так с помощью РНГА положитель-

ная реакция отмечена в 52 % исследованных образцов крови людей с бактериологически подтвержденным диагнозом, а с помощью ИФА – в 98 % случаев. Показано, что использование этих тест-систем обеспечивает не только высокий уровень дифференциальной диагностики иерсиниозов и других кишечных инфекций со сходными клиническими признаками, но и позволяет выявлять заболевание на ранних стадиях независимо от сероварианта возбудителя. Для расширения сферы применения ИФА тест-систем на основе поринов иерсиний мы провели их апробацию в целях установления этиологии ряда иммунопатологических состояний.

Использование ИФА тест-системы на основе поринов иерсиний для диагностики вторично-очаговых форм иерсиниозов. Согласно современным представлениям, аутоиммунные проявления при иерсиниозах, они относятся к вторичным (приобретенным) иммунодефицитным состояниям, и сопровождаются поражением функций практических всех органов и систем человека (сердечно-сосудистой и нервной систем, опорно-двигательного аппарата, мочевыводящей системы и желудочно-кишечного тракта). В случае иерсиниозной инфекции иммунодефицит обусловлен не только антигенной мимикрией, но и способностью иерсиний к длительной персистенции в организме, в результате чего нарушается функция либо отдельных компонентов иммунной системы, либо всей системы в целом. Например, нарушается иммунореактивность, развивается повышенная сенсибилизация по отношению к различным антигенам микробов, приводящая к токсико-инфек-

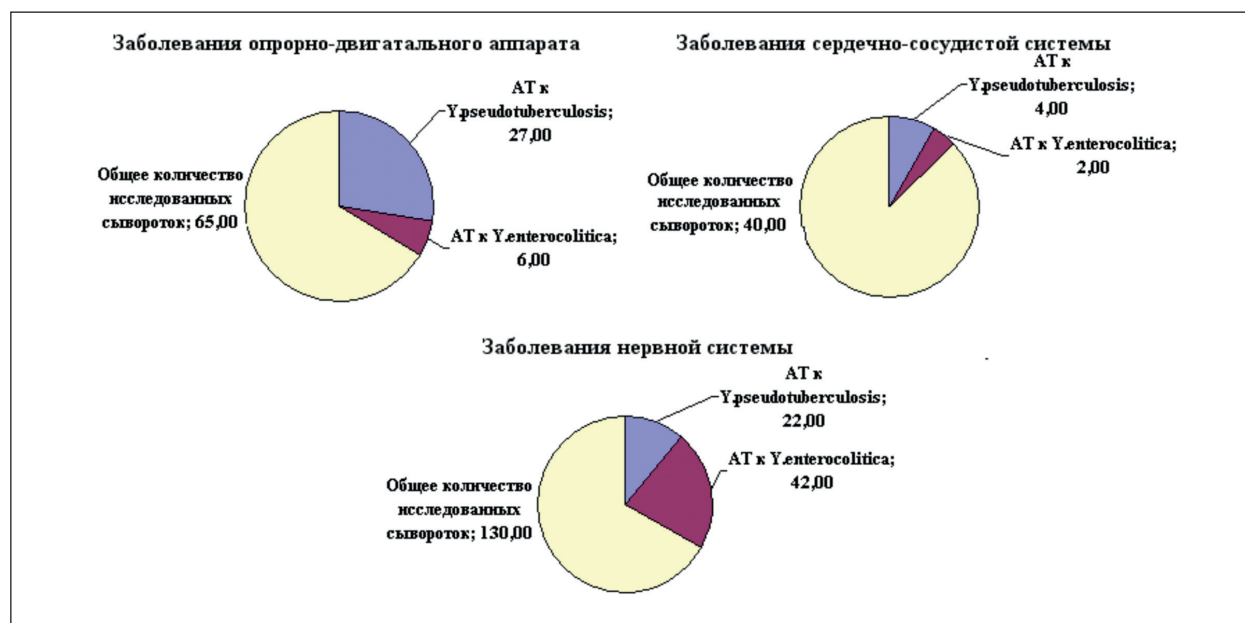


Рисунок 4 – Определение антител к поринам иерсиний в сыворотках крови больных с заболеваниями опорно-двигательного аппарата, поражениями периферической нервной системы, сердечно-сосудистой системы. (Данные авторов)

ционным перегрузкам, наблюдается истощение компонентов системы комплемента, нарушение в синтезе иммуноглобулинов, а также снижение функциональной активности фагоцитирующих клеток. При этом вероятность развития иммунодефицитного заболевания при иерсиниозах определяется не только патогенным потенциалом самого возбудителя, но и особенностями иммунной системы организма и эпигенетическими факторами (возраст, пол, сопутствующие заболевания, анамнез жизни).

Диагностика вторично-очаговых форм иерсиниозов и сопутствующих им вторичных иммунодефицитов представляет собой сложную задачу: во-первых, ввиду того, что появление симптоматики соматического заболевания является, как правило, отсроченным и обусловлено осложнением инфекционного процесса и, во-вторых, ввиду отсутствия эффективных и специфичных методов диагностики.

Разработанные нами тест-системы на основе неспецифических поринов *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* были использованы для обследования больных с различными заболеваниями опорно-двигательного аппарата (ревматоидный артрит), периферической нервной системы (вертебральная люмбагия, дискогенный радикулит) и сердечно-сосудистой системы (кардиопатия). В результате анализа сывороток крови больных специфические антитела к поринам иерсиний были обнаружены в 51, 49 и 15 % случаев соответственно (рисунок 4) [46].

Полученные данные могут свидетельствовать о формировании системных заболеваний в

результате перенесенного иерсиниоза. Использование рекомбинантного порина вместо нативного белка в тест-системе для диагностики острых и вторично-очаговых форм псевдотуберкулеза не снижает эффективности обнаружения антител в сыворотке крови больных людей [47].

ИФА тест-системы на основе поринов *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* также использованы для подтверждения возможного участия иерсиниозной инфекции в индукции диффузного узлового нетоксического зоба [48]. В результате анализа индивидуальных сывороток крови 59 пациентов специфические антитела к поринам *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* обнаружены в диагностическом титре (1:800–1:1600) в 73 % случаев: в 58,4 % – к порину *Y. enterocolitica* и 14,6 % – к порину *Y. pseudotuberculosis*. В контрольной группе здоровых доноров специфических антител к поринам иерсиний мы не обнаружили (рисунок 5).

Анализ специфического гуморального иммунного ответа больных с различными нозологическими формами заболеваний иерсиниозной этиологии показал высокий уровень специфических иммуноглобулинов (Ig) класса G и в 3–5 раз более низкий уровень IgM к поринам *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* [49]. Этот результат может свидетельствовать о постоянной антигенной стимуляции иммунной системы, вызванной длительной персистенцией возбудителя, что, как было указано выше, характерно для иерсиниозов. Иммунологический анализ крови обследованных пациентов показал, что иммунодефициты иерсиниозной этиологии

сопровожаются нарушениями регуляции звеньев молекулярно-клеточного гомеостаза, развитие их происходит по типу аутоиммунного заболевания, характеризующегося длительной иммуноактивацией или иммуносупрессией [50, 51]. У больных обнаружено также снижение фагоцитарной активности, свидетельствующее о хронизации воспалительного процесса. У пациентов с различными нозологическими формами заболеваний иерсиниозной этиологии выявлены также изменения в цитокиновом статусе. При развитии постиерсиниозных патологических процессов (вторично-очаговых форм иерсиниозов) происходят изменения уровней как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов [48]. Это происходит, вероятно, в результате постоянной антигенной стимуляции иммунной системы, вызванной персистенцией возбудителя и, как следствие, инициации существенных иммунопатологических изменений в организме обследованных больных. Развивающееся в результате этих процессов системное заболевание может не напоминать инфекционный процесс, если не знать о его первопрочине.

Протективная активность поринов иерсиний. Одним из критериев при выборе антигена для включения в вакцину является возможность получения протективного иммунного ответа, обеспечивающего одновременную защиту макроорганизма против нескольких видов возбудителей инфекционных заболеваний, принадлежащих к одному роду. Один из подходов, который широко применяется для достижения такого результата, связан с поиском в первичной структуре белка антигенных эпитопов и синтез соответствующих этим участкам пептидов, способных без конъюгации с инерным белковым носителем стимулировать образование в макроорганизме антител определенной специфичности. Иммунизация порином НМ *Y. pseudotuberculosis* обеспечивает защиту экспериментальных животных при заражении их летальными дозами различных сероваров псевдотуберкулезного микроба. Учитывая высокую степень подобия первичных структур поринов иерсиний, можно предполагать, что протективные препараты, созданные на их основе, будут защищать от инфекций, вызываемых всеми видами патогенных иерсиний [52].

Иммунохимические свойства синтетических антигенных пептидов. В соответствии с представлениями современной иммунологии, необходимым условием образования антител к искусственным пептидным антигенам является наличие в их первичной структуре не только В-, но и Т-клеточных эпитопов, которые участвуют в образовании тройного комплекса между антигеном, молекулой главного комплекса гистосовместимости II типа (МНС II) и Т-клеточным

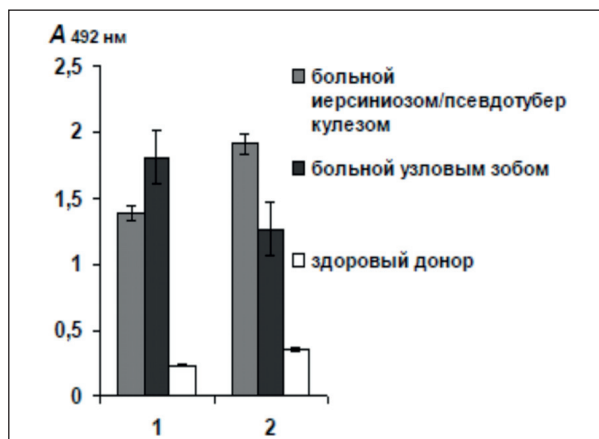


Рисунок 5 – Определение специфических антител к поринам из *Y. enterocolitica* (1) и *Y. pseudotuberculosis* (2) в сыворотках крови больных с диффузным узловым нетоксическим зобом с помощью ИФА тест-систем на основе поринов иерсиний. В качестве положительного контроля использовались сыворотки крови больных иерсиниозом/псевдотуберкулезом, в качестве отрицательного контроля – сыворотки крови здоровых доноров

рецептором. Образовавшийся комплекс стимулирует Т-хелперные клетки и одновременно активирует В-клетки. Поиск консервативных участков, включающих Т- и В-клеточные эпитопы, и соответственно пригодных для создания мультивалентных протективных препаратов для защиты от иерсиниозных инфекций, проводился по АК последовательностям поринов патогенных видов иерсиний с помощью компьютерных программ. Для расчетов Т-эпитопов использовали программы ProPred, SYFPEITHI, RANKPEP, особое внимание уделяли консервативным пептидам, обладающим широким спектром специфичности по отношению к различным аллельным вариантам лимфоцитарных антигенов человека [53]. Сайты связывания с В-клетками для неспецифических поринов *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* и *Y. pestis* были рассчитаны с помощью программы ADEPT [54].

В результате проведенных расчетов были выбраны 4 пептида, каждый из которых состоял из 20-ти АК остатков и имел различную степень гомологии с соответствующими фрагментами молекул OmpC и OmpF поринов патогенных иерсиний (таблица 4). Предсказанные пептиды были синтезированы в формате мультивалентных антигенных пептидов (МАП 1-4). Для подтверждения того, что в состав МАП включены участки, соответствующие В-эпитопам, была изучена способность этих пептидов к взаимодействию со специфическими антителами в сыворотках крови кроликов, иммунизированных тримерами поринов *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*, и с анти-

Таблица 4 – Степень гомологии (в %) антигенных пептидов с фрагментами молекул поринов трех видов иерсиний по АК последовательности

МАП*	Структура пептида	<i>Y. pseudotuberculosis</i>		<i>Y. enterocolitica</i>		<i>Y. pestis</i>	
		OmpF	OmpC	OmpF	OmpC	OmpF	OmpC
1	WEYQVNLNKAENEDGNHDSF	45	100	45	75	45	100
2	YTQTYNLTRFGDFSNRSSDA	45	100	40	85	35	100
3	LQYQGKNDNRSEVKEANGDGF	100	90	85	65	100	35
4	RTLQDKYGSTAEGDKAQAWN	100	40	80	35	100	30

* Мультивалентный антигенный пептид.

телями в сыворотках крови людей, переболевших псевдотуберкулезом или кишечным иерсиниозом. Полученные результаты показали, что наиболее полно В-эпитопы представлены в МАП-1 (петля L2, 3-4 β-стрэнды) [53]. Участки, соответствующие петле L2, по-видимому, включают в себя «универсальный» для поринов обоих видов иерсиний фрагмент последовательности, на который в теплокровном организме вырабатываются антитела, как при иммунизации, так и при естественном течении инфекции (рисунок 6А).

Интересно также отметить существование определенной взаимосвязи между конформацией порина, к которому были получены антитела и эффективностью взаимодействия этих антител с синтетическими пептидами. Обнаружено, что МАП-1 по-разному реагирует с антителами, полученными к комплексу пептидогликан-белок (ПГ-б) *Y. pseudotuberculosis*, в состав которого входит порин в нативной тримерной форме, к изолированному тримеру (ИТ) и к термоденатурированному мономеру порина (ТМ). Как показали результаты ИФА, эффективность взаимодействия МАП с раз-

личными антителами уменьшается в ряду ПГ-б → ИТ → ТМ (рисунок 6Б) [53].

Поскольку в состав МАП-1 включены антигенные детерминанты петли L2, играющей важную роль в стабилизации пространственной структуры тримера порина в НМ бактерий, полученные результаты подтверждают литературные данные о том, что четвертичная структура порина и стабильность его β-барреля важны для полноценной презентации антигенных эпитопов на поверхности молекулы [53].

Наличие в последовательности синтезированных МАП участков, соответствующих Т-клеточным эпитопам, определяли по способности пептидов индуцировать образование антител у экспериментальных животных. Показано, что все синтетические пептиды стимулируют развитие гуморального иммунного ответа. Однако наиболее иммуногенными оказались пептиды МАП-2 (петля L6, 11 β-стрэнд) и МАП-4 (петля L5, 10 β-стрэнд), в состав которых входят участки полипептидной цепи, расположенные на внешней стороне β-барреля, и, возможно, более доступные

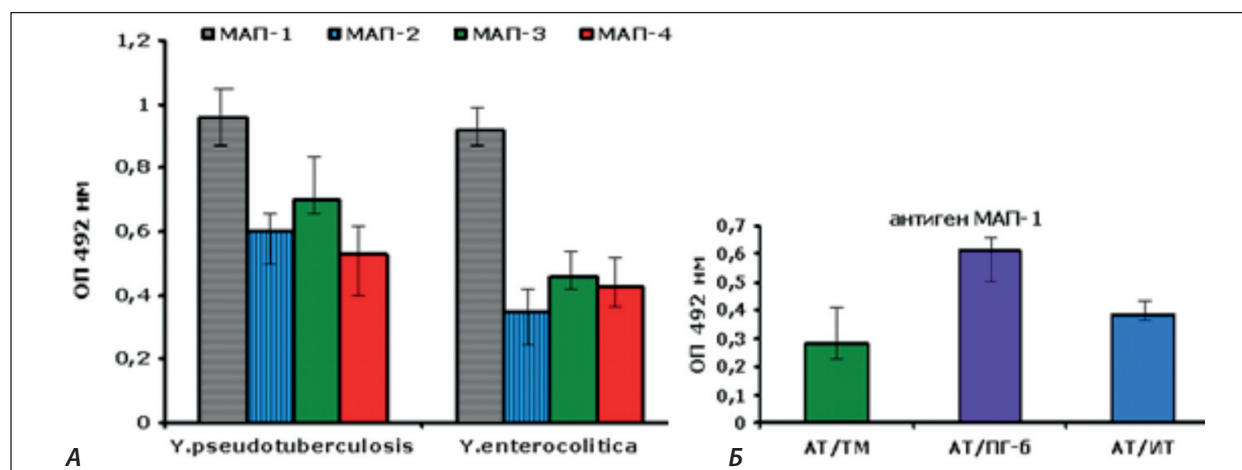


Рисунок 6 – ИФА взаимодействия МАП: А – с антителами в сыворотках крови больных кишечным иерсиниозом (*Y. enterocolitica*), псевдотуберкулезом (*Y. pseudotuberculosis*); Б – кроликов, иммунизированных различными образцами поринов *Y. pseudotuberculosis*: мономером (АТ/ТМ), комплексом пептидогликан-белок (АТ/ПГ-б), изолированным тримером (АТ/ИТ). (Данные авторов)

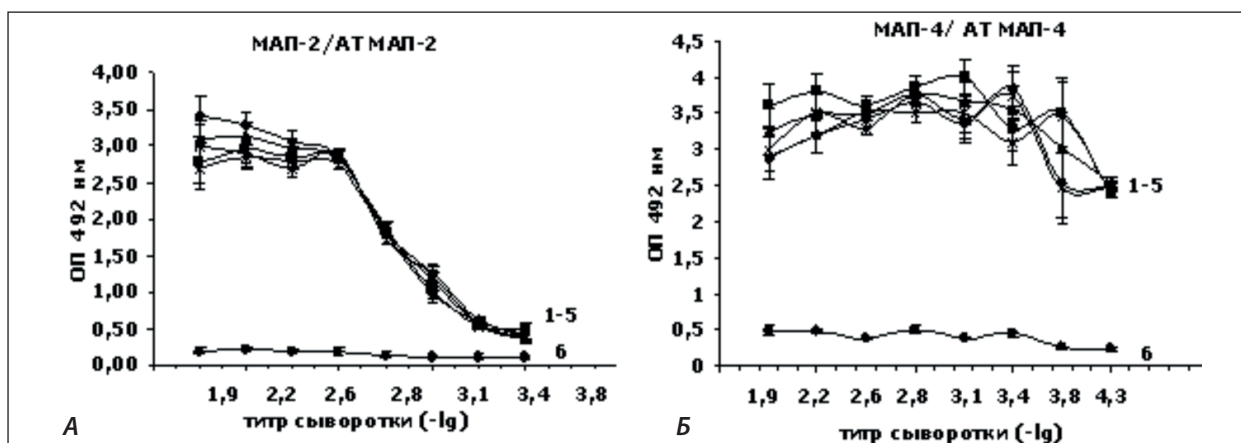


Рисунок 7 – Определение титра индивидуальных сывороток крови мышей, иммунизированных синтетическими пептидами МАП-2 (А) и МАП-4 (Б). Иммунные сыворотки (1-5), нормальная сыворотка (6)

для взаимодействия с антигенпрезентирующими клетками макроорганизма (рисунок 7).

В настоящее время не существует средств и способов специфической защиты от иерсиниозов. В связи с этим, полученные результаты можно рассматривать как один из этапов разработки поливалентных вакцинных препаратов для защиты от инфекций, вызываемых возбудителями кишечного иерсиниоза, псевдотуберкулеза и чумы.

Порины иерсиний как эффекторы патогенеза иерсиниозной инфекции. Порины, участвующие в развитии инфекционного процесса, способны встраиваться в мембрану эукариотических клеток и проявлять по отношению к ним цитолитическое действие. Изучение взаимодействия бактерий псевдотуберкулеза с перитонеальными макрофагами показало, что предварительная иммунизация белых беспородных мышей порином из НМ *Y. pseudotuberculosis* приводит к значительному увеличению фагоцитарного показателя (ФП), то есть количества макрофагов, участвующих в фагоцитозе. На плазмалемме макрофагов иммунных животных адсорбировалось больше бактерий, чем на клетках неиммунизированных мышей, усиливалась погложительная и переваривающая активность макрофагов. Фагоцитарное число (ФЧ), то есть количество бактерий, обнаруженных в одном макрофаге мышей, иммунизированных порином из псевдотуберкулезного микроба, было почти в три раза больше по сравнению с ФЧ неиммунных животных [55].

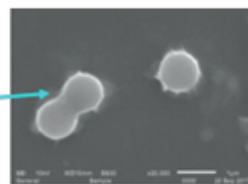
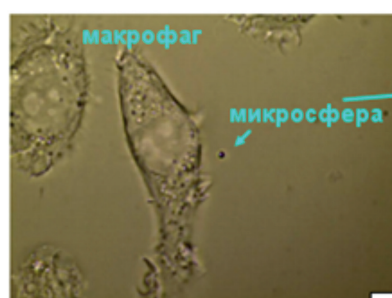
Предварительная обработка эпителиальных клеток Rh₉₂₉ нативной (тримерной) формой порина НМ *Y. pseudotuberculosis* приводила к проникновению в монослой на 2 порядка большего числа клеток псевдотуберкулезного микроба по сравнению с контролем. Таким образом, впервые было экспериментально продемонстрировано влияние изолированного порообразующего белка на бактериальную инвазию [56].

Методом оптической ловушки оценена участие поринов OmpF и OmpC *Y. pseudotuberculosis*

в адгезии микробных клеток к макрофагам J774 (рисунок 8).

С использованием набора микросфер, функционализированных OmpF и OmpC поринами, показано, что OmpF белок, продуцируемый в НМ при пониженной температуре культивирования, участвует в адгезии бактерий *Y. pseudotuberculosis* на поверхности макрофагов, в то время, как порин OmpC, синтезируемый при температуре тела теплокровного организма, указанным свойством не обладает. Эти результаты могут объясняться термоиндуцибельными различиями в первичной структуре пориновых белков и конформационными особенностями наружных петель молекул OmpF и OmpC. Высказано предположение о значимости выявленных различий для эффективной циркуляции в природе и проявления инвазивных свойств *Y. pseudotuberculosis* как возбудителя сапрозоонозной инфекции [57].

Изучение влияния компонентов НМ бактерий, в том числе бактерий рода *Yersinia*, на иммунный ответ макроорганизма с помощью модели *in vivo* в настоящее время используется достаточно редко. Тем не менее, считают, что экспериментальная инфекция у грызунов (мышей, крыс) и кроликов в общих чертах воспроизводит патогенез иерсиниозов у человека. Определение уровней различных цитокинов в сыворотке крови иммунизированных животных позволяют судить об особенностях развития защитных реакций организма, в отличие от экспериментов *in vitro* с использованием клеточных линий, которые показывают функциональное состояние только соответствующих клеток. Мы исследовали действие OmpF порина НМ *Y. pseudotuberculosis*, на синтез цитокинов и хемокинов у мышей после однократной иммунизации. В качестве антигена был использован рекомбинантный порин (rOmpF). Мышей иммунизировали однократно 100 мкг rOmpF или rOmpF, обработан-



Силу разорвавшейся связи между двумя объектами оценивается по амплитуде резкого скачка сигнала при отведении макрофага и, после пересчета, выражали в пиконьютонах (пН)

Тип микросфер	Число отрывов	F max
"OmpF"	457	54.73
"OmpC"	104	36.51

Рисунок 8 – Оценка силы адгезии функционализированных поринами микросфер к макрофагам J774 методом «оптической ловушки». (Данные авторов)

ным полимиксином В (rOmpF/ПМВ). Сравнение стимулирующей активности двух образцов рекомбинантного белка: rOmpF, содержащего примесь эндотоксина, и rOmpF/ПМВ, обрабо-

танного полимиксином В, позволило выявить действие собственно порина.

Обнаружено, что повышение уровня экспрессии провоспалительных эндогенных меди-

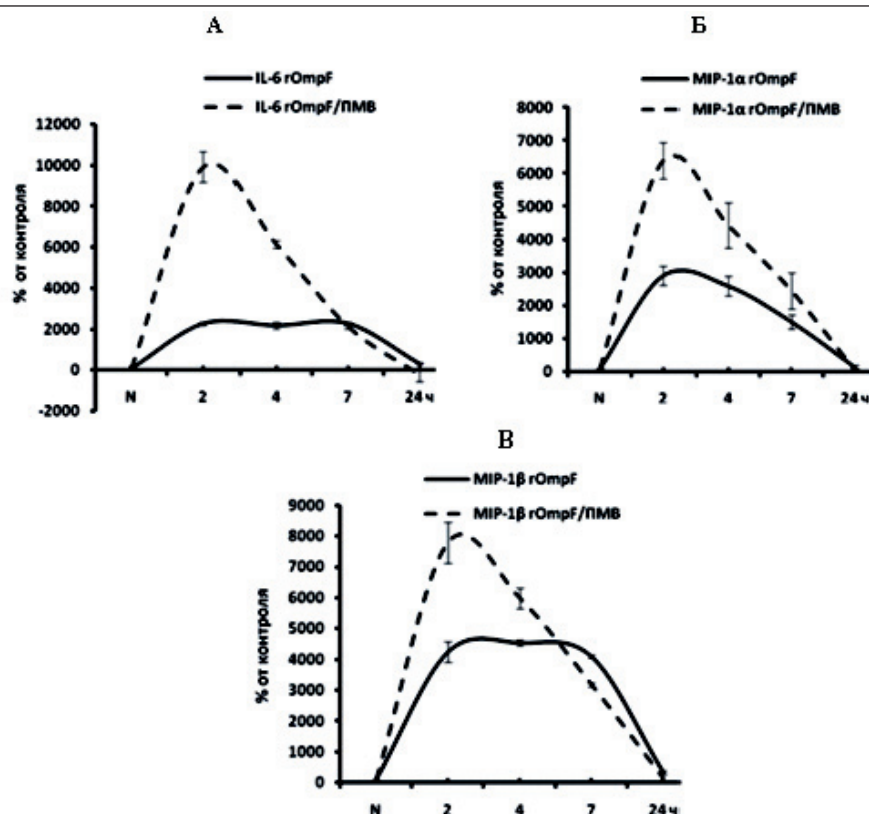


Рисунок 9 – Синергический эффект порина. Изменение содержания цитокина IL-6 (А) и хемокинов MIP-1α (Б), MIP-1β (В) (% контроля) в сыворотке крови мышей BALB/c после однократного введения rOmpF и rOmpF/ПМВ, 100 мкг / мышь. Для получения иммунной сыворотки отбор проб крови проводился через 2, 4, 6 и 24 часа. Первая точка на графике соответствует уровню цитокинов в неиммунной сыворотке, который принимается за 100 %. Данные приведены как средние значения трех независимых экспериментов с учетом стандартного отклонения. * - Достоверные различия по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$). (Данные авторов)

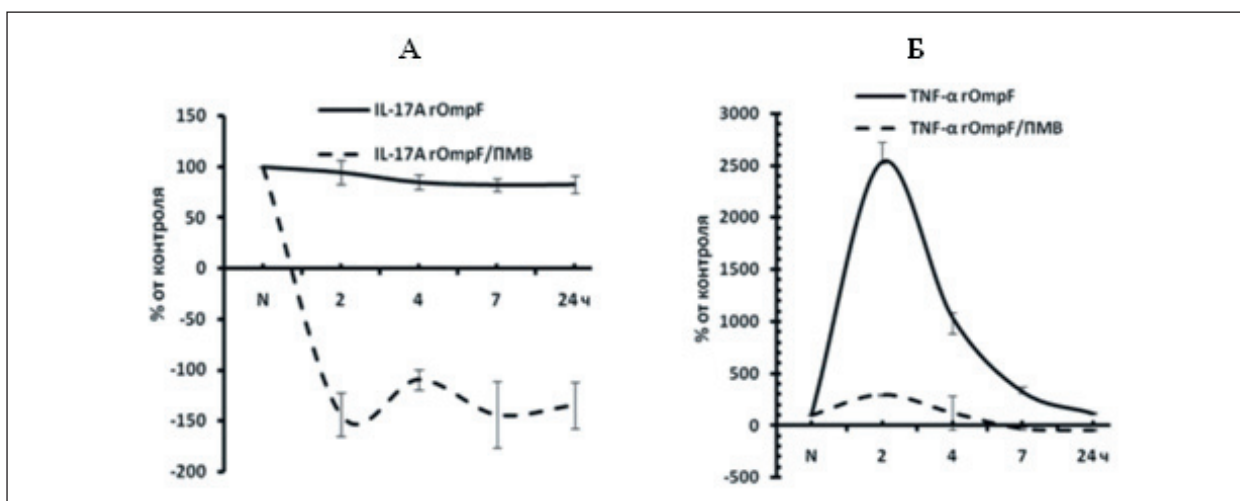


Рисунок 10 – Ингибирующий эффект порина. Изменение содержания цитокина IL-17A (А) и фактора некроза опухоли TNFα (Б) в сыворотке крови мышей BALB/c после однократного введения rOmpF и rOmpF/ПМВ, 100 мкг / мышь. Для получения иммунной сыворотки отбор проб крови проводился через 2, 4, 6 и 24 часа. Первая точка на графике соответствует уровню цитокинов в неиммунной сыворотке, которая принимается за 100 %. Данные приведены как средние значения трех независимых экспериментов с учетом стандартного отклонения. * - Достоверные различия по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$)

аторов у мышей, иммунизированных порином rOmpF, обусловлено, в основном, примесью ЛПС. Порин, в свою очередь, проявляет либо синергический (рисунок 9), либо ингибирующий эффект (рисунок 10) по отношению к действию ЛПС, высоко эффективного иммуномодулирующего компонента НМ бактерий.

Полученные результаты свидетельствуют о важной роли поринов на ранних этапах развития инфекции [58].

Порин OmpF из *Y. pseudotuberculosis* и рецептор тиреотропного гормона человека являются перекрестными антигенами. В последние 20 лет во всем мире наблюдается рост аутоиммунных заболеваний. Собранные к настоящему времени данные свидетельствуют о том, что на неспособность иммунной системы отличить чужеродные антигены от собственных негативно влияют генетические факторы и экологические триггеры. Определение конкретных триггеров аутоиммунных расстройств необходимо для разработки новых методов лечения аутоиммунных заболеваний. На современном этапе развития представлений об аутоиммунных процессах все возрастающее внимание уделяется не только их участию в физиологической регуляции жизнедеятельности организма, но и выяснению их роли в патогенезе различных заболеваний [59].

Хотя генетический фон хозяина и дает определенный вклад в характер иммунного ответа, основной экологической причиной, ответственной за возникновение аутоиммунных заболеваний,

считаются инфекционные агенты вирусной и бактериальной природы. Об этом свидетельствуют многочисленные данные эпидемиологических и молекулярных исследований [60]. Предполагают, что существуют разнообразные механизмы, с помощью которых инфекции могут инициировать и/или усугубить аутоиммунные заболевания. Одним из них является перекрестная специфичность, или молекулярная мимикрия. Термин «молекулярная мимикрия» был введен в 1964 г. R.T. Damian [61], предположившим, что чужеродные антигены инфекционных агентов могут обладать сходством с белками макроорганизма, и это структурное подобие служит в качестве защитного механизма микроорганизма от иммунной системы хозяина⁵. Сходство может быть выражено как общей АК последовательностью (линейными или составными эпитопами), так и подобием конформации молекул возбудителя и хозяина. Позднее было высказано предположение о том, что молекулярная мимикрия антигенных детерминант микроорганизмов может вызвать аутоиммунные реакции, вредные для организма-хозяина [62].

Одним из самых распространенных аутоиммунных заболеваний, является диффузный токсический зоб (ДТЗ), или болезнь Грейвса. Аутоиммунные заболевания щитовидной железы (ЩЖ) часто сопровождаются тиреотоксикозом. Парадоксальность этой ситуации заключается в том, что в качестве этиологической причины развития ДТЗ может выступать перенесенная ранее бактериальная инфекция, в том числе

⁵ Такая гомология может быть вызвана сходно направленным действием естественного отбора на структуры, выполняющие сходные функции, т.е. эволюционной конвергенцией (примечание редакции).

иерсиниозная, но сам ДТЗ к инфекционным болезням не относится [63, 64].

Причиной развития подобных заболеваний может быть длительная персистенция иерсиний в организме, а также возможная молекулярная мимикрия бактериальных антигенов и антигенов тканей ЩЖ человека. Так, подобное явление описано для OmpF порина НМ возбудителя кишечного иерсиниоза (*Y. enterocolitica*) и рецептора тиреотропного гормона человека (рТТГ), локализованного на поверхности фолликулярных клеток ЩЖ [65]. В пользу этого предположения также говорит тот факт, что у части пациентов с поражением ЩЖ в сыворотках крови обнаруживаются антитела к клеткам иерсиний [66, 67]. В этих же сыворотках определяется высокое содержание аутоантител к антигенам тканей ЩЖ, а именно к тиреоглобулину и рТТГ [67]. Кроме того, у пациентов с диагностированной болезнью Грейвса выявляется высокий уровень специфических иммуноглобулинов класса G (IgG) и низкий уровень иммуноглобулинов класса M (IgM) к поринам *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* [67]. Высокий уровень IgG является косвенным признаком того, что в организме сохраняется персистенция иерсиний и, следовательно, осуществляется постоянная антигенная стимуляция иммунной системы. Таким образом, можно предположить наличие причинно-следственной связи между кишечной иерсиниозной инфекцией и формированием аутоиммунного заболевания ЩЖ [66, 67].

Принимая во внимание эти наблюдения, некоторые исследователи считают [68], что антитела к порообразующим белкам, иммунодоминантным антигенам НМ иерсиний, могут взаимодействовать с рецептором тиреотропного гормона, вызывая избыточную стимуляцию щитовидной железы и, тем самым, провоцируя развитие аутоиммунного состояния организма с симптомами тиреотоксикоза. Однако подобная взаимосвязь описана только для поринов *Y. enterocolitica*, возбудителя кишечного иерсиниоза.

Нами было проведено специальное исследование для выявления серологической перекрестной реактивности между порином OmpF из *Y. pseudotuberculosis* и рТТГ [69]. В ходе работы из хирургической ткани ЩЖ пациентов с клиническими и диагностическими признаками ДТЗ были получены экстракты, содержащие рТТГ. Было показано, что моноклональные антитела к рТТГ (мАТ) взаимодействуют как с антигенами в экстрактах ткани щитовидной железы, так и с OmpF порином. Однако по данным иммуноблоттинга тримерная форма белка не выявлялась этими антителами (рисунок 11).

Для объяснения полученных экспериментальных данных нами были построены теоретические модели пространственных структур мономерных и тримерных комплексов порина

с антителами к рТТГ (рисунок 12). Согласно результатам молекулярного моделирования, порин, будучи в мономерной форме, может, подобно рецептору, свободно взаимодействовать с мАТ. Но когда образуется тример порина, гидрофобная область, которая находится в зоне взаимодействия порина с антителом, закрывается. Это обстоятельство, а также другие пространственные перегруппировки АК остатков, которые определяют эффективность связывания, предотвращают взаимодействие между тримером YrOmpF и мАТ к рТТГ. Данные результаты, полученные *in vitro* и *in silico*, подтвердили существование феномена молекулярной мимикрии. Таким образом, аутоиммунное заболевание ЩЖ (болезнь Грейвса), которое иногда возникает после перенесенного псевдотуберкулеза, может быть следствием структурного и антигенного сходства между иммунодоминантным белком НМ и рТТГ человека. Следует отметить, что такое антигенное подобие с рецептором до сих пор было известно только для OmpF порина из *Y. enterocolitica* [68], для порина из псевдотуберкулезного микроба это показано впервые [69].

Помимо самого факта экспериментального и теоретического доказательства существования явления молекулярной мимикрии, по результатам этого исследования можно сделать еще один интересный вывод. Поскольку в АК последовательности порина и рецептора не обнаружено одинаковых достаточно протяженных участков, причиной АГ подобия является, скорее всего, подобие конформации отдельных участков их пространственной структуры. В связи с этим конформационная пластичность третичной структуры поринов, о которой упоминалось ранее, приобретает особую роль в проявлении этими белками различных видов биологической активности.

На модели *in vivo* продемонстрирована способность антител к OmpC и OmpF поринам НМ *Y. pseudotuberculosis* инициировать повышение уровня тироксина (Т4) в крови экспериментальных животных [70].

BALB/c мыши были иммунизированы различными антигенами: рекомбинантным OmpF порином в растворимой мономерной форме (РБ), изолированными тримерами поринов или антителами к ним. Обнаружено, что после иммунизации животных уровень Т4 в крови повышался соответственно в 5,47 и 22,3 раза в случае OmpF и OmpC поринов, а также в 9,28 и 14,29 раза в случае антител к этим белкам (рисунок 13). Иммунизация порином РБ не вызвала достоверного увеличения содержания Т4. Возможно, это объясняется тем, что антисыворотка к этому образцу порина не содержит антител, специфичных к конформационным антигенным детерминантам нативных белков.

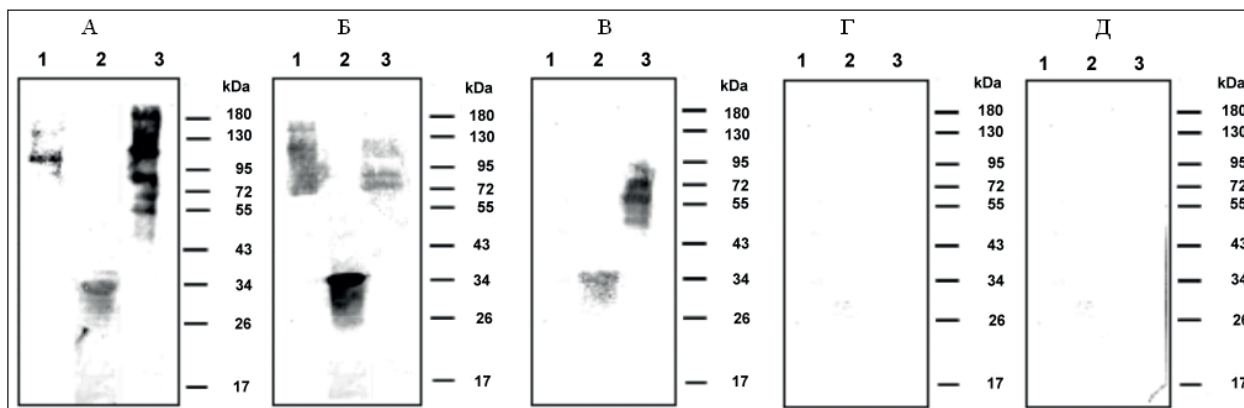


Рисунок 11 – Иммуноблоттинг взаимодействия порина *OmpF* из *Y. pseudotuberculosis* (тримера (*YpOmpFt*) – 1, мономера (*YpOmpFm*) – 2, и комбинированного PBS-экстракта из тканей пациентов с болезнью Грейвса – 3 с: (А) пуловая сыворотка крови пациентов (разведение 1/200); (Б) сыворотка крови мыши, иммунизированной *YpOmpFt* (разведение 1/2000); (В) МАТ 3В12 к рТТГ (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, США, разведение 1/500); (Г) неиммунная мышиная сыворотка (разведение 1/2000); (Д) сыворотка крови здорового донора (разведение 1/200). (Данные авторов)

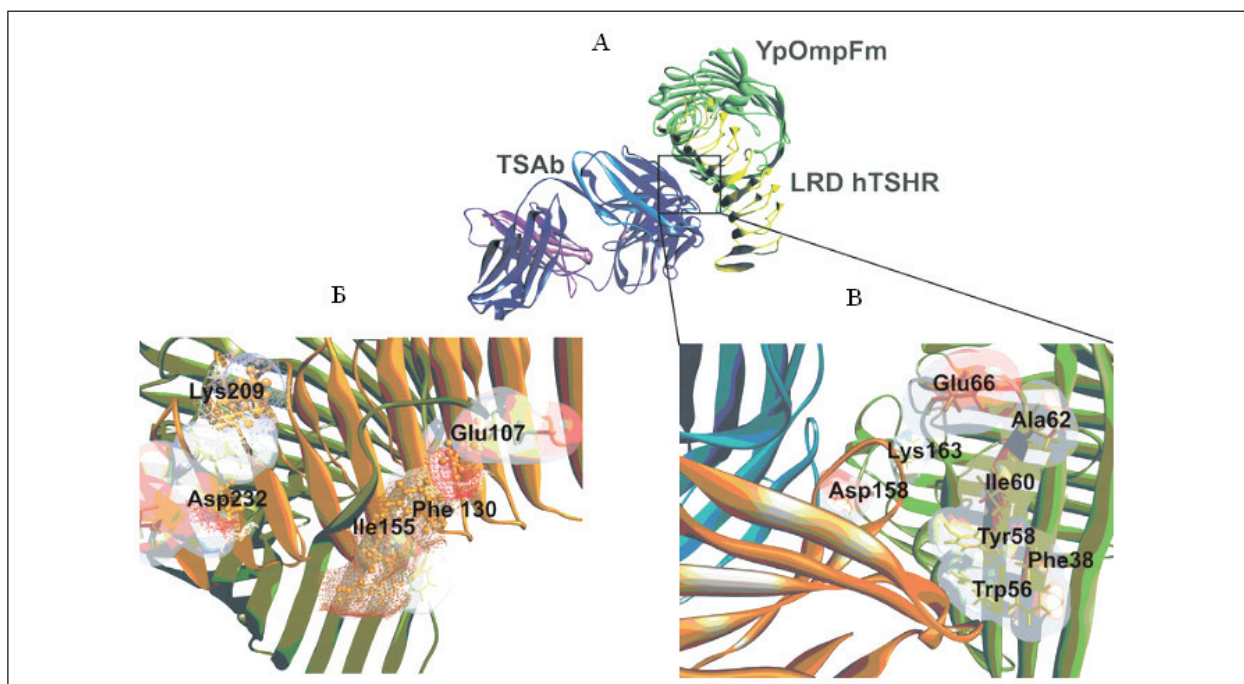


Рисунок 12 – Диаграмма суперпозиции интерфейсов мономера *OmpF* и рТТГ взаимодействующих со стимулирующим антителом к рТТГ (*OmpF* – зеленый, рТТГ – коричневый, антитело – синий) (А). Участки со сходными характеристиками показаны как сплошные и пунктирные области (Б). АК остатки мономера *OmpF*, которые формируют конформационные антигенные эпитопы, комплементарные антителу к рТТГ, обозначены разными цветами, соответственно заряду (положительные – синие, отрицательные – красные) (В). (Данные авторов)

Заключение

Неспецифические порины клеточной стенки грамотрицательных бактерий детально изучены с помощью различных подходов, включающих кристаллографический анализ, атомно-силовую микроскопию, компьютерное моделирование, а также методы электрофизиологии и биохимии. Это привело к хорошему пониманию процесса

транспортировки низкомолекулярных веществ через клеточную стенку бактерий. Пориновые белки являются отличной моделью для расширения знаний о полном «жизненном цикле» сложных мембранных белков в клетке: от фолдинга до спонтанного разворачивания и/или протеолитического расщепления, и их работы как наномеханизмов. Отдельные аспекты

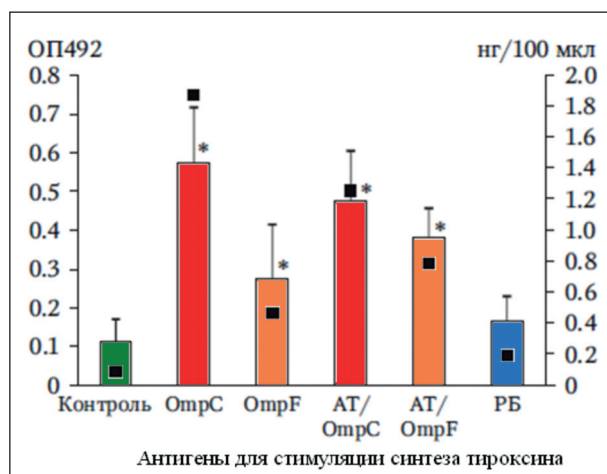


Рисунок 13 – Определение Т4 в сыворотках крови иммунизированных мышей с помощью ИФА, белые столбики – значения оптической плотности (ОП 492 нм) реакции при взаимодействии моноклональных антител к Т4 с тироксином, черные квадраты – содержание Т4 в 100 мкл сыворотки (Т4, нг/100 мкл). Символом * отмечены значения, достоверно отличные от контроля ($p < 0,05$) [70]

Информация о конфликте интересов

Авторы заявляют, что исследования проводились при отсутствии любых коммерческих или финансовых отношений, которые могли бы быть истолкованы как потенциальный конфликт интересов.

Сведения о рецензировании

Статья прошла открытое рецензирование двумя рецензентами, специалистами в данной области. Рецензии находятся в редакции журнала.

Список источников

1. Онищенко Г.Г. Эпидемиологическая обстановка и основные направления борьбы с инфекционными болезнями в Российской Федерации за период 1991–1996 гг // Эпидемиология и инфекц. болезни. 1997. № 3. С. 4–13.
2. Покровский В.М., Онищенко Г.Г., Черкасский Б.Л. Эволюция инфекционных болезней в России в XX веке. М.: Медицина: 2003.
3. Онищенко Г.Г. О государственных мерах по предупреждению распространения в Российской Федерации заболеваемости инфекционными гепатитами // Эпидемиология и инфекц. болезни. 2002. №3. С.4–8.
4. Покровский В.М., Малеев В.В. Актуальные проблемы инфекционной патологии // Эпидемиология и инфекц. болезни. 1999. № 2. С. 17–20.
5. Инфекционная заболеваемость в Российской Федерации за январь - сентябрь 1996 года: Официальная информация // Эпидемиология и инфекц. болезни / Госкомсанэпиднадзор России, Российский информационно-аналитический центр. 1997. № 1. С. 64.
6. Чеснокова М.В., Климов В.Т., Никитин А.Я. и др. Анализ эпидемиологической ситуации по псевдотуберкулезу и кишечному иерсиниозу в России и прогноз заболеваемости на среднесрочную перспекти-

функционирования пориновых белков, такие как молекулярные основы и физиологическая подоплека регуляторных процессов, еще предстоит изучить. Практическая сторона исследования пориновых белков бактерий заключается в возможности использования их консервативных трансмембранных эпитопов в качестве видоспецифических антигенов химических и генно-инженерных вакцин, способных обеспечивать протективный иммунитет против грамотрицательных возбудителей опасных инфекций (псевдотуберкулез, легионеллез, чума, сеп, мелиоидоз и др.), в том числе и при ингаляционном заражении. Порины перспективны для разработки ИФА тест-систем для диагностики псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза, а также иммунопатологий, обусловленных иерсиниями. Учитывая высокую степень подобия первичных структур поринов иерсиний, можно предполагать, что протективные препараты, созданные на их основе, будут защищать одновременно от инфекций, вызываемых возбудителями кишечного иерсиниоза, псевдотуберкулеза и чумы.

ву // ЗНиСО 2018. № 9. С. 59–64.

7. Черкасский Б.Л. Актуальные проблемы эпидемиологии в конце XX – начале XXI веков. М.: ГВКГ им. Н.Н. Бурденко, 2004. 50 с.

8. Кутырев В.В. Актуальные проблемы особо опасных инфекционных болезней и санитарная охрана территории в современных условиях // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2008. № 1. С. 17–23.

9. Косилко С.А., Балахонов С.В., Бренёва Н.В. и др. Эпидемиологическая ситуация по зоонозным, природно-очаговым инфекционным болезням в Сибири и на Дальнем востоке в 2013 г. и прогноз на 2014 г. // Проблемы особо опасных инфекц. 2014. Вып. 2. С. 53–57.

10. Сомов Г.П. Иерсиниозная инфекция на современном этапе // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1997. № 5. С. 7–11.

11. Ценева Г.Я., Солодовникова Н.Ю., Воскресенская Е.А. Молекулярные аспекты вирулентности иерсиний // Клини. микробиол. антимикроб. химиотер. 2002. Т. 4, № 3. С. 248–266.

12. Сомов Г.П., Покровский В.И., Беседнова Н.Н., Антоненко Ф.Ф. Псевдотуберкулез. М. Медицина: 2001.

13. Ценева Г.Я., Воскресенская Е.А., Солодовникова Н.Ю. и др. Биологические свойства иерсиний и лабо-

ракторная диагностика псевдотуберкулеза и иерсиниоза. Пособие для врачей. СПб.: НИИЭМ им. Пастера. 2001.

14. Сидельникова С. М., Ющенко Г. В., Асеева Э. И. Иерсиниозы как терапевтическая проблема // Терапевт. арх. 2000. № 11. С. 27–30.

15. Ценева Г.Я. Иерсинии и иерсиниозы. СПб. Медмассмедиа, 2006.

16. Granfors K., Merilahti-Palo R., Luukkainen R. et al. Persistence of *Yersinia antigens* in peripheral blood cells from patients with *Yersinia enterocolitica* O:3 infection with or without reactive arthritis // *Arthritis & Rheum.* 1998. V. 41. P. 855–862.

17. Оберт А.С., Хильчук В.П., Гончаренко А.И. Прогностическое значение иммунологической реактивности у детей, больных псевдотуберкулезом // Педиатрия. Журн. им. Г.Н. Сперанского. 1996. № 2. С. 35–38.

18. Воскресенская Е.А., Ценева Г.Я. Иммунологические показатели при патологии, обусловленной иерсиниозами // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1996. № 5. С. 68–73.

19. Железникова Г.Ф., Иванова В.В., Монахова Н.Е. Варианты иммунопатогенеза острых инфекций у детей. СПб. 2007.

20. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2003. V. 67, № 4. P. 593–656.

21. Achouak W., Heulin T., Pages J.P. Multiple facets of bacterial porins // *FEMS Microbiol. Lett.* 2001. V. 199, № 1. P. 1–7.

22. Rawling E.G., Martin N.L., Hancock R.E.W. Epitope mapping of the *Pseudomonas aeruginosa* major outer membrane porin protein OprF // *Infect. Immun.* 1995. V. 63, № 1. P. 38–42.

23. Супотницкий М.В. Эффективное патентование средств специфической профилактики инфекционных заболеваний // Биотехнология. 1997. № 9–10. С. 56–79.

24. Новикова О.Д., Соловьева Т.Ф. Неспецифические порины наружной мембраны грамотрицательных бактерий: структура и свойства // Биол. мембраны. 2009. Т. 26, № 1. С. 6–20.

25. Портнягина О.Ю., Новикова О.Д., Соловьева Т.Ф. Иммунологические свойства неспецифических поринов наружной мембраны грамотрицательных бактерий // Биол. мембраны. 2005. Т. 22, № 5. С. 357–365.

26. Вострикова О.П., Ким Н.Ю., Лихацкая Г.Н. и др. Структура и функция порообразующих белков бактерий рода *Yersinia*. 1. Выделение и сравнительная характеристика физико-химических свойств и функциональной активности поринов иерсиний // Биоорган. химия. 2006. Т. 32, № 4. С. 371–383.

27. Чистюлин Д. К., Новикова О. Д., Портнягина О. Ю. и др. Выделение и характеристика OmpF-подобного порина наружной мембраны *Yersinia ruckeri* // Биол. мембраны. 2012. Т. 29, № 3. С. 1–9.

28. Новикова О.Д., Хоменко В.А., Емельяненко В.И. и др. OmpC-подобный порин из *Yersinia pseudotuberculosis*: молекулярная характеристика, физико-химические и функциональные свойства // Биол. мембраны. 2011. Т. 28, № 1. С. 1–16.

29. Вострикова О.П., Исаева М.П., Лихац-

кая Г.Н. и др. OmpC –подобный порин наружной мембраны *Yersinia enterocolitica*: молекулярная структура и функциональная активность // Биохимия. 2013. Т. 78, № 5. С. 550–560.

30. Новикова О.Д., Федорева Л.И., Хоменко В.А. и др. Влияние способа экстракции порообразующего белка из *Yersinia pseudotuberculosis* на его макромолекулярную организацию // Биоорган. химия. 1993. Т. 19, № 5. С. 536–547.

31. Хоменко В.А., Новикова О.Д., Федорева Л.И. и др. Порин из *Yersinia enterocolitica* O:3. Выделение и характеристика // Биол. мембраны. 1994. Т. 11, № 1. С. 68–79.

32. Novikova O.D., Chistyulin D.K., Khomenko V.A. et al. Peculiarities of thermal denaturation of OmpF porin from *Yersinia ruckeri* // *Molecular BioSystems.* 2017. V. 13. P. 1854–1862.

33. Чистюлин Д.К., Новикова О.Д., Зелепуга Е.А. и др. Аномально высокий потенциал закрытия канала порина OmpF из *Yersinia ruckeri*: роль заряженных остатков и внутримолекулярных связей // *Acta Naturae.* 2019. Т. 11, № 3. С. 42.

34. Bystritskaya E., Stenkova A., Chistuylin D. et al. Adaptive responses of outer membrane porin balance of *Yersinia ruckeri* under different incubation temperature, osmolarity, and oxygen availability // *Microbiology Open.* 2016. V. 5, № 4. P. 597–603.

35. Selinsky B.S. Protein-lipid interactions and membrane function // In: The structure of biological membranes. Yeagle P., ed. Boca Raton: CRC Press. 1992. P. 603–651.

36. Новикова О.Д., Вакорина Т.И., Хоменко В.А. и др. Влияние условий культивирования на пространственную структуру OmpF-подобного порина из наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* // Биохимия. 2008. Т. 73. С. 173–184.

37. Bogdanov M., Dowhan W., Vitrac H. Lipids and topological rules governing membrane protein assembly // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. V. 1843, № 8. P. 1475–1488.

38. Красикова И.Н., Бахолдина С.И., Соловьева Т.Ф. Глюкоза как фактор среды роста, регулирующий липидный состав *Yersinia pseudotuberculosis* // Биохимия. 2001. Т. 66, Вып. 8. С. 1122–1127.

39. Быстрицкая Е.П., Стенкова А.М., Портнягина О.Ю. и др. Регуляция экспрессии главного порина *Yersinia pseudotuberculosis* в условиях антибиотикового стресса // Мол. генетика, микробиол., вирусол. 2014. № 2. С. 17–21.

40. Achtman M., Zurth K., Morelli G. et al. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999. V. 96. P. 14043–14048.

41. Kleinschmidt J.H. Membrane proteins – Introduction // *Cell Mol. Life Sci.* 2003. V. 60, № 8. P. 1527–1528.

42. Likhatskaya G.N., Solov'eva T.F., Novikova O.D. et al. Homology models of the *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* general porins and comparative analysis of their functional and antigenic regions // *J. Biomol. Struct. Dyn.* V. 23, № 2. P. 163–174.

43. Гордеев А.В., Портнягина О.Ю., Вострико-

ва О.П. и др. патент РФ № 98122085/14, опубл. 20.07.2000, Бюл. № 20.

44. Вострикова О.П., Портнягина О.Ю., Малашенкова В.Г. и др. патент РФ № 98122085/14, опубл. 27.11.2008, Бюл. № 20.

45. Портнягина О.Ю., Вострикова О.П., Хоменко В.А. и др. Апробация иммуноферментной тест-системы на основе белка порина из *Yersinia pseudotuberculosis* для диагностики псевдотуберкулеза (экстраинтестинального иерсиниоза) у детей // Иммунология. 2000. № 2. С. 59–61.

46. Вострикова О.П., Портнягина О.Ю., Хоменко В.А. и др. Новый подход в диагностике иерсиниозов // Цитокины и воспаление. 2005. Т. 4. № 3. С. 132–133.

47. Портнягина О.Ю., Сидорова О.В., Хоменко В.А. и др. Изучение иммуногенных свойств рекомбинантного OmpF-подобного порина из наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* // Бюлл. эксп. биол. мед. 2009. № 7. С. 85–88

48. Вострикова О.П., Портнягина О.Ю., Новикова О.Д. и др. Клинико-иммунологическая характеристика больных ревматоидным артритом, ассоциированным с иерсиниозной инфекцией // Рос. аллергол. журн. 2012. №5, вып.1. С. 55–57.

49. Вострикова О.П., Портнягина О.Ю., Хоменко В.А. и др. Новый подход в диагностике иерсиниозов // Цитокины и воспаление. 2005. Т. 4, № 3. С. 132–133.

50. Вострикова О.П., Портнягина О.Ю., Новикова О.Д. и др. Иммунологическая характеристика вторичных иммунодефицитов, ассоциированных с иерсиниозной инфекцией // Рос. аллергол. журн. 2013. № 2, ч. 2. С. 61–63.

51. Vostrikova O.P., Portnyagina O.Yu., Khomenko V.A. et al. Clinical and immunological characteristic of the diffusion nodale of nontoxic goiter of *Yersinia* etiology // European Science and Technology: materials of the 4th international research and practice conference, Munich, Germany, Apr. 10th–11th, 2013. Munich: Vela-Verlag Waldkraiburg, 2013. Vol. 2. P. 536–544.

52. Дармов И.В., Маракулин И.В., Погорельский И.П. и др. Профилактика экспериментальной псевдотуберкулезной инфекции с помощью иммунизации порином из *Yersinia pseudotuberculosis* // Бюлл. эксп. биол. мед. 1999. Т. 127, № 2. С. 221–223.

53. Портнягина О.Ю., Сидорова О.В., Новикова О.Д. и др. Иммунохимическая характеристика синтетических пептидов, включающих Т- и В-клеточные эпитопы неспецифических поринов патогенных иерсиний // Биоорг. химия. 2010. Т. 36, №6. С. 779–788.

54. Антонец Д.В., Бакулина А.Ю., Портнягина О.Ю. и др. Предсказание антигенно-активных районов OmpF-подобного порина *Yersinia pseudotuberculosis* // Докл. АН. 2007. Т. 414, № 4. С. 1–3.

55. Тимченко Н.Ф., Новикова О.Д., Павлова Т.Н. и др. Протективные свойства порина из внешней мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* // Журн. микробиол. 1990. № 11. С. 48–50.

56. Новикова О.Д., Лихацкая Г.Н., Фролова Г.М. и др. Молекулярная организация и биологические свой-

ства иерсинина – порина из псевдотуберкулезного микроба *Yersinia pseudotuberculosis* // Биол. мембраны. 1990. Т. 7, № 5. С. 453–461.

57. Бывалов А.А., Конышев И.В., Новикова О.Д. и др. Адгезивность поринов OmpF и OmpC *Yersinia pseudotuberculosis* к макрофагам J774 // Биофизика. 2018. Т. 63, вып. 5. С. 913–922.

58. Портнягина О.Ю., Кузмич А.С., Хоменко В.А. и др. Индукция синтеза интерлейкинов и активаторов хемотаксиса под действием OmpF порина из *Yersinia pseudotuberculosis* на модели *in vivo* // Цитокины и воспаление. 2019. № 1. С. 1–5.

59. Cusick M.F., Libbey J.E., Fujinami R.S. et. al., Molecular mimicry as a mechanism of autoimmune disease // Clin. Rev. Allergy Immunol. 2012 V. 42, № 1. P. 102–111.

60. Fujinami R.S. Viruses and autoimmune disease—two sides of the same coin? // Trends Microbiol. 2001. V. 9. P. 377–381.

61. Damian R.T. Molecular mimicry: antigen sharing by parasite and host and its consequences // Am. Nat. 1964. V. 98. P. 129–149.

62. Blank M. Molecular Mimicry and Auto-Immunity // Clin. Rev. Allergy Immunol. 2007. V. 32. P.111–118.

63. Corapçioğlu D., Tonyukuk V., Kiyan M. et al. Relationship between thyroid autoimmunity and *Yersinia enterocolitica* antibodies // Thyroid. 2002. V. 12, № 7. P. 613–617.

64. Wenzel B.E., Strieder T.M., Gaspar. E. et al. Chronic infection with *Yersinia enterocolitica* in patients with clinical or latent hyperthyroidism // Adv. Exp. Med. Biol. 2003. V. 529. P. 463–466.

65. Kunihiro T., Chazenbalk G.D., McLaehlan S.M., Rapoport B. Subunit structure of thyrotropin receptors expressed on the cell surface // J. Biol. Chem. 1999. V. 274, № 48. P. 33979–33984.

66. Тимченко Н.Ф., Андрюков Б.Г. Выявление антител к *Yersinia enterocolitica* у пациентов с аутоиммунными тиреопатиями // Инфекц. болезни. 2012. Т. 10, № 4. С. 37–40.

67. Vostrikova O.P., Portnyagina O.Yu., Khomenko V.A. et. al. Clinical and immunological characteristic of the diffusion nodale of nontoxic goiter of *Yersinia* etiology // European Science and Technology: materials of the 4th international research and practice conference, Munich, Germany, Apr. 10th–11th, 2013. Munich: Vela-Verlag Waldkraiburg, 2013; 2:536–544.

68. Wang Z., Zhang Q., Lu J. et. al. Identification of outer membrane porin F protein of *Yersinia enterocolitica* recognized by antithyrotropin receptor antibodies in Grave's disease and determination of its epitope using mass spectrometry and bioinformatics tools // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2010. V. 95, № 8. P. 4012–4020.

69. Portnyagina O., Zelepuga E., Khomenko V. et. al. *In silico* and *in vitro* analysis of cross-reactivity between *Yersinia pseudotuberculosis* OmpF porin and thyroid-stimulating hormone receptor // Int. J. Biol. Macromol. 2018. V. 107(Pt B). P. 2484–2491.

70. Портнягина О.Ю., Голотин В.А., Зелепуга Е.А.

Неспецифические порины *Yersinia pseudotuberculosis* у мышей // Бюлл. эксп. биол. мед. 2018. Т. 166, № 12. как индукторы экспериментального гипертиреоза С. 714–717.

Об авторах

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН (ТИБОХ ДВО РАН), Проспект 100 лет Владивостоку, д. 159, г. Владивосток, 690022, Российская Федерация.

Новикова Ольга Данииловна. Главный научный сотрудник, д-р хим. наук Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова.

Портнягина Ольга Юрьевна. Старший научный сотрудник, канд. биол. наук Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова.

Вострикова Ольга Павловна. Старший научный сотрудник, канд. хим. наук

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России), Проспект Острякова, д. 2, г. Владивосток, 690002, Российская Федерация.

Иванис Виктория Александровна. Профессор, д-р мед. наук Тихоокеанского государственного медицинского университета

Контактная информация для всех авторов: novolga_05@mail.ru
Контактное лицо: Новикова Ольга Данииловна; novolga_05@mail.ru

Immunotropic and Immunogenic Properties of Nonspecific Yersinia Porins

O.D. Novikova¹, O.Yu. Portnyagina¹, O.P. Vostrikova¹, V.A. Ivanis²

¹G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Prospect 100 let Vladivostoku, 159, Vladivostok 690022, Russian Federation

²Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Pacific State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation (FSBEI HE PSMU MOH Russia), Prospect Ostryakova, 2, Vladivostok, 690002, Russian Federation.

The purpose of the study is to summarize our own data and literature data on the significance of pore-forming proteins of the outer membrane of *Yersinia* as factors of their pathogenicity and as diagnostic and protective antigens, and their role in pathological processes considered non-infectious. In the last decades of the last century, the epidemic significance of intestinal yersiniosis caused by the bacteria of *Yersinia* genus, *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica*, which are the «doubles» of the plague pathogen (*Yersinia pestis*) by genetic, cultural, biochemical, and other properties, has significantly increased. It has been established that acute yersiniosis infections without effective treatment can pass into secondary focal forms, leading to the development of systemic diseases that were not previously considered infectious (for example, Grave's disease). They are characterized by multiple organ lesions, dysfunctions of the cardiovascular and nervous systems, musculoskeletal system, urinary system and gastrointestinal tract, which is a consequence of autoimmune processes based on the ability of *Yersinia* to molecular mimicry. The paper shows that porins play a significant role in the development of the infectious process and can be considered as pathogenic factors of bacteria. Together with other components of the outer membrane of gram negative bacteria, they provide adhesion, invasion and colonization of the cells of the host organism by bacteria. Porins can affect a number of eukaryotic cell functions, including cytokine expression, receptor activation, apoptosis induction, and regulation of the actin cytoskeleton. It has been established that pore-forming *Yersinia* proteins are protective antigens. The administration of them to laboratory animals induces the formation of species-specific immunity, which allows us to recommend porin protein as a component of chemical and genetic engineering vaccines. Porins are promising for the development of ELISA test systems for the diagnosis of pseudotuberculosis and intestinal yersiniosis, as well as immunopathologies caused by *Yersinia* bacteria. Given the high degree of similarity of the primary

structures of Yersinia porins, it can be assumed that protective preparations created on their basis will protect against infections caused by intestinal yersiniosis, pseudotuberculosis and plague pathogens.

Keywords: *Graves disease; diagnostic antigen; immunotropic properties; intestinal yersiniosis; molecular mimicry; nanomechanisms; yersinia porins; protective antigen; pseudotuberculosis; recombinant porins; thyrotoxicosis; chemical vaccine; plague.*

For citation: Novikova O.D., Portnyagina O.Yu., Vostrikova O.P., Ivanis V.A. Immunotropic and Immunogenic Properties of Nonspecific Yersinia Porins // *Journal of NBC Protection Corps.* 2019. V. 3. № 4. P. 362–384. <https://doi.org/10.35825/2587-5728-2019-3-4-350-372>

Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationship that could be construed as a potential conflict of interest.

Peer review information

The article has been peer reviewed by two experts in the respective field. Peer reviews are available from the Editorial Board.

References

1. Onishchenko G. G. The epidemiological situation and the main directions of the fight against infectious diseases in the Russian Federation for the period 1991-1996 // *Epidemiol. Infect. Dis.* 1997. №3. P.4–13 (in Russian).
2. Pokrovsky V.M., Onishchenko G.G., Cherkassky B.L. The evolution of infectious diseases in Russia in the XX century. M.: 2003 (in Russian).
3. Onishchenko G.G. On government measures to prevent the spread of infectious hepatitis in the Russian Federation // *Epidemiol. Infect. Dis.* 2002. №3. P. 4–8 (in Russian).
4. Pokrovsky V.M., Maleev V.V. Actual problems of infectious pathology // *Epidemiol. Infect. Dis.* 1999. № 2. P. 17–20 (in Russian).
5. Infectious morbidity in the Russian Federation for January – September 1996: Official information // *Epidemiology and Infectious Diseases / Goskomsanepidnadzor of Russia, Russian Information and Analytical Center.* 1997. № 1. P. 64 (in Russian).
6. Chesnokova M.V., Klimov V.T., Nikitin A.Ya., Yarygina M.B., Innokentieva T.I., Balakhonov S.V. Analysis of the epidemiological situation of pseudotuberculosis and intestinal yersiniosis in Russia and the prognosis of morbidity for the mediumterm // *Public Health and Habitat.* 2018. № 9. P. 59–64 (in Russian).
7. Cherkassky B.L. Modern features of the epidemiology of intestinal infections in the Russian Federation // *Epidemiol. Infect. Dis.* 1997. № 5. P. 12–15 (in Russian).
8. Kutyrev V.V. Actual problems of especially dangerous infectious diseases and sanitary protection of the territory in modern conditions // *Zh. Microbiol., Epidemiol., Immunobiol.* 2008. № 1. P. 17–23 (in Russian).
9. Kosilko S.A., Balakhonov S.V., Brenyova N.V. et al. Epidemiological situation of zoonotic, natural focal infectious diseases in Siberia and the Far East in 2013 and forecast for 2014 // *Problems of Particularly Dangerous Infections.* 2014. Issue. 2. P. 53–57 (in Russian).
10. Somov G.P. Yersiniosis infection at the present stage // *Zh. Microbiol., Epidemiol., Immunobiol.* 1997. № 5. P. 7–11 (in Russian).
11. Tseneva G.Ya., Solodovnikova N.Yu., Voskresenskaya E.A. Molecular aspects of Yersinia virulence // *Clin. Microbiol. Antimicrobial Chemother.* 2002. Vol. 4, №. 3. P. 248–266 (in Russian).
12. Somov G.P., Pokrovsky V.I., Besednova N.N., Antonenko F.F. Pseudotuberculosis. M.: 2001 (in Russian).
13. Tseneva G.Ya., Voskresenskaya E.A., Solodovnikova N.Yu. et al. Biological properties of Yersinia and laboratory diagnosis of pseudotuberculosis and yersiniosis. Manual for doctors. Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg: 2001 (in Russian).
14. Sidelnikova S. M., Yushchenko G. V., Aseeva E. I. Yersiniosis as a therapeutic problem // *Therapeutic Archive.* 2000. № 11. P. 27–30 (in Russian).
15. Tseneva G.Ya. Yersinia and yersiniosis. St. Petersburg. Media: 2006 (in Russian).
16. Granfors K., Merilahti-Palo R., Luukkainen R. et al. Persistence of Yersinia antigens in peripheral blood cells from patients with Yersinia enterocolitica O:3 infection with or without reactive arthritis // *Arthritis & Rheum.* 1998. V. 41. P. 855–862.
17. Obert A.S., Khilchuk V.P., Goncharenko A.I. The prognostic value of immunological reactivity in children with pseudotuberculosis // *G.N. Speransky Pediatrics. Zhurn.* 1996. № 2. P. 35–38 (in Russian).
18. Voskresenskaya E.A., Tseneva G.Ya. Immunological parameters in pathology due to yersiniosis // *Zh. Microbiol., Epidemiol. Immunobiol.* 1996. № 5. P. 68–73 (in Russian).
19. Zheleznikova G.F., Ivanova V.V., Monakhova N.E. Immunopathogenesis options for acute infections in children. St. Petersburg Tome: 2007 (in Russian).
20. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2003. V. 67, №. 4. P. 593–656.
21. Achouak W., Heulin T., Pages J.P. Multiple facets of bacterial porins // *FEMS Microbiol. Lett.* 2001. V. 199, № 1. P. 1–7.
22. Rawling E.G., Martin N.L., Hancock R.E.W. Epitope mapping of the *Pseudomonas aeruginosa* major

outer membrane porin protein OprF // Infect. Immun. 1995. V. 63, № 1. P. 38–42.

23. Supotnitsky M.V. Effective patenting of means of specific prophylaxis of infectious diseases // Biotechnology. 1997. № 9-10. P. 56–79 (in Russian).

24. Novikova O.D., Soloviev T.F. Nonspecific porins of the outer membrane of gram negative bacteria: structure and properties // Biol. membrany. 2009. V. 26, № 1. P. 6–20 (in Russian).

25. Portnyagina O.Yu., Novikova O.D., Solovieva T.F. Immunological properties of non-specific porins of the outer membrane of gram negative bacteria // Biol. membrany. 2005. V. 22, № 5. P. 357–365 (in Russian).

26. Vostrikova O.P., Kim N.Yu., Likhatskaya G.N. et al. The structure and function of pore-forming proteins of bacteria of the genus *Yersinia*. 1. Isolation and comparative characteristics of the physicochemical properties and functional activity of *Yersinia* porins // Bioorgan. Khimiya. 2006. V. 32, № 4. P. 371–383 (in Russian).

27. Chistyulin D.K., Novikova O.D., Portnyagina O. Yu. et al. Isolation and characterization of an OmpF-like porin of the outer membrane of *Yersinia ruckeri* // Biol. membrany. 2012. V. 29, № 3. P. 1–9 (in Russian).

28. Novikova O.D., Khomenko V.A., Emelyanenko V.I. et al. OmpC-like porin from *Yersinia pseudotuberculosis*: molecular characterization, physicochemical and functional properties // Biol. membrany. 2011. V. 28, № 1. P. 1–16 (in Russian).

29. Vostrikova O.P., Isaeva M.P., Likhatskaya G.N. et al. OmpC – like porins of the outer membrane of *Yersinia enterocolitica*: molecular structure and functional activity // Biokhimiya. 2013. V. 78, № 5. P. 550–560 (in Russian).

30. Novikova O.D., Fedoreeva L.I., Khomenko V.A. et al. Effect of the method of extraction of a poreforming protein from *Yersinia pseudotuberculosis* on its macromolecular organization // Bioorgan. Khimiya. 1993. V. 19, № 5. P. 536–547 (in Russian).

31. Khomenko V.A., Novikova O.D., Fedoreeva L.I. et al. Porin from *Yersinia enterocolitica* O: 3. Isolation and characterization // Biol. membrany. 1994. V. 11, № 1. P. 68–79 (in Russian).

32. Novikova O.D., Chistyulin D.K., Khomenko V.A. et al. Peculiarities of thermal denaturation of OmpF porin from *Yersinia ruckeri* // Molecular BioSystems. 2017. V. 13. P. 1854–1862.

33. Chistyulin D.K., Novikova O.D., Zelepuga E.A. et al. Abnormally high closing potential of the porin channel OmpF from *Yersinia ruckeri*: the role of charged residues and intramolecular bonds // Acta Naturae. 2019. V. 11, № 3. P. 89–98 (in Russian).

34. Bystritskaya E., Stenkova A., Chistyulin D. et al. Adaptive responses of outer membrane porin balance of *Yersinia ruckeri* under different incubation temperature, osmolarity, and oxygen availability // Microbiology Open. 2016. V. 5, № 4. P. 597–603.

35. Selinsky B.S. Protein-lipid interactions and membrane function // In: The structure of biological membranes. Yeagle P, ed. Boca Raton: CRC Press. 1992. P. 603–651.

36. Novikova O.D., Vakorina T.I., Khomenko V.A.

et al. Influence of cultivation conditions on the spatial structure of OmpF-like porin from the outer membrane of *Yersinia pseudotuberculosis* // Biokhimiya. 2008. V. 73. P. 173–184 (in Russian).

37. Bogdanov M., Dowhan W., Vitrac H. Lipids and topological rules governing membrane protein assembly // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1843, № 8. P. 1475–1488.

38. Krasikova I.N., Bakholdina S.I., Solovyova T.F. Glucose as a growth medium factor regulating the lipid composition of *Yersinia pseudotuberculosis* // Biokhimiya. 2001. V. 66, № 8. P. 1122–1127 (in Russian).

39. Bystritskaya E.P., Stenkova A.M., Portnyagina O.Yu. et al. Regulation of expression of the main porin of *Yersinia pseudotuberculosis* under conditions of antibiotic stress // Mol. Gen., Microbiol. Virol. 2014. № 2. P. 17–21 (in Russian).

40. Achtman M., Zurth K., Morelli G. et al. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis* // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1999. V. 96. P. 14043–14048.

41. Kleinschmidt J.H. Membrane proteins – Introduction // Cell Mol. Life Sci. 2003. V. 60, № 8. P. 1527–1528.

42. Likhatskaya G.N., Solov'eva T.F., Novikova O.D. et al. Homology models of the *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* general porins and comparative analysis of their functional and antigenic regions // J. Biomol. Struct. Dyn. V. 23, № 2. P. 163–174.

43. Patent RF № 98122085/14 (in Russian).

44. Patent RF № 98122085/14 (in Russian).

45. Portnyagina O.Yu., Vostrikova O.P., Khomenko V.A. et al. Testing an enzyme-linked immunosorbent assay system based on the porin protein from *Yersinia pseudotuberculosis* for the diagnosis of pseudotuberculosis (extraintestinal yersiniosis) in children // Immunology. 2000. № 2. P. 59–61 (in Russian).

46. Vostrikova O.P., Portnyagina O.Yu., Khomenko V.A. and others. A new approach in the diagnosis of yersiniosis // Cytokines and inflammation. 2005. V. 4, № 3. P. 132–133 (in Russian).

47. Portnyagina O.Yu., Sidorova O.V., Khomenko V.A. et al. Study of the immunogenic properties of recombinant OmpF-like porin from the outer membrane of *Yersinia pseudotuberculosis* // Bull. Exp. Biol. Med. 2009. № 7. P. 85–88 (in Russian).

48. Vostrikova O.P., Portnyagina O.Yu., Novikova O.D. et al. Clinical and immunological characteristics of patients with rheumatoid arthritis associated with yersiniosis infection // Ros. Allerg. Zh. 2012. № 5, issue 1. P. 55–57 (in Russian).

49. Vostrikova O.P., Portnyagina O.Yu., Khomenko V.A. et al. A new approach in the diagnosis of yersiniosis // Cytokines and inflammation. 2005. V. 4, № 3. P. 132–133 (in Russian).

50. Vostrikova O.P., Portnyagina O.Yu., Novikova O.D. et al. Immunological characteristics of secondary immunodeficiencies associated with yersiniosis infection // Ros. Allerg. Zh. 2013. № 2, part 2. P. 61–63 (in Russian).

51. Vostrikova O.P., Portnyagina O.Yu., Khomenko V.A. et al. Clinical and immunological

characteristic of the diffusion nodale of nontoxic goiter of *Yersinia* etiology // European Science and Technology: materials of the 4th international research and practice conference, Munich, Germany, Apr. 10th–11th, 2013. Munich: Vela-Verlag Waldkraiburg, 2013. V. 2. P. 536–544.

52. Darmov I.V., Marakulin I.V., Pogorelsky I.P. et al. Prevention of experimental pseudotuberculosis infection by immunization with porin from *Yersinia pseudotuberculosis* // Bull. Exp Biol. Med. 1999. V. 127, № 2. P. 221–223 (in Russian).

53. Portnyagina O.Yu., Sidorova O.V., Novikova O.D. et al. Immunochemical characterization of synthetic peptides, including T- and B-cell epitopes of nonspecific porins of pathogenic *Yersinia* // Bioorgan. Khimiya. 2010. V. 36, № 6. P. 779–788 (in Russian).

54. Antonets D.V., Bakulina A.Yu., Portnyagina O.Yu. et al. Prediction of antigenically active regions of OmpF-like porin *Yersinia pseudotuberculosis* // Dokl. Biochem. Biophys. 2007. V. 414, № 4. P. 1–3 (in Russian).

55. Timchenko N.F., Novikova O.D., Pavlova T.N. et al. Protective properties of porin from the outer membrane of *Yersinia pseudotuberculosis* // Zh. Microbiol., Epidemiol. Immunobiol. 1990. № 11. P. 48–50 (in Russian).

56. Novikova O.D., Likhatskaya G.N., Frolova G.M. et al. Molecular organization and biological properties of yersinin – porin from the pseudotuberculosis microbe *Yersinia pseudotuberculosis* // Biol. Membrany. 1990. V. 7, № 5. C. 453–461 (in Russian).

57. Byvalov A.A., Konyshov I.V., Novikova O.D. et al. Adhesion of OmpF and OmpC porins of *Yersinia pseudotuberculosis* to macrophages J774 // Biophysics. 2018. V. 63, № 5, P. 913–922 (in Russian).

58. Portnyagina O.Yu., Kuzmich A.S., Khomenko V.A. et al. Induction of the synthesis of interleukins and chemotaxis activators under the influence of OmpF porin from *Yersinia pseudotuberculosis* in an in vivo model // Cytokines and inflammation. 2019. № 1 (in Russian).

59. Cusick M.F., Libbey J.E., Fujinami R.S. et al. Molecular mimicry as a mechanism of autoimmune disease // Clin. Rev. Allergy Immunol. 2012 V. 42. № 1. P. 102–111.

60. Fujinami R.S. Viruses and autoimmune disease – two sides of the same coin? // Trends Microbiol. 2001. V. 9. P. 377–381.

61. Damian R.T. Molecular mimicry: antigen sharing by parasite and host and its consequences // Am. Nat. 1964. V. 98. P. 129–149.

62. Blank M. Molecular Mimicry and Auto-Immunity // Clin. Rev. Allergy Immunol. 2007. V. 32. P.111–118.

63. Corapçioğlu D., Tonyukuk V., Kiyan M. et al. Relationship between thyroid autoimmunity and *Yersinia enterocolitica* antibodies // Thyroid. 2002. V. 12, № 7. P. 613–617.

64. Wenzel B.E., Strieder T.M., Gaspar. E. et al. Chronic infection with *Yersinia enterocolitica* in patients with clinical or latent hyperthyroidism // Adv. Exp. Med. Biol. 2003. V. 529. P. 463–466.

65. Kunihiro T., Chazenbalk G.D., McLaehlan S.M., Rapoport B. Subunit structure of thyrotropin receptors expressed on the cell surface // J. Biol. Chem. 1999. V. 274, № 48. P. 33979–33984.

66. Timchenko N.F., Andryukov B.G. Detection of antibodies to *Yersinia enterocolitica* in patients with autoimmune thyroidopathy // Infect. Dis. 2012. V. 10, № 4. P. 37–40 (in Russian).

67. Vostrikova O.P., Portnyagina O.Yu., Khomenko V.A. et al. Clinical and immunological characteristic of the diffusion nodale of nontoxic goiter of *Yersinia* etiology // European Science and Technology: materials of the 4th international research and practice conference, Munich, Germany, Apr. 10th–11th, 2013. Munich: Vela-Verlag Waldkraiburg, 2013; 2:536–544.

68. Wang Z., Zhang Q., Lu J. et al. Identification of outer membrane porin F protein of *Yersinia enterocolitica* recognized by antithyrotropin receptor antibodies in Grave's disease and determination of its epitope using mass spectrometry and bioinformatics tools // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2010. V. 95, № 8. P. 4012–4020.

69. Portnyagina O., Zelepuga E., Khomenko V. et al. In silico and in vitro analysis of cross-reactivity between *Yersinia pseudotuberculosis* OmpF porin and thyroid stimulating hormone receptor // Int. J. Biol. Macromol. 2018. V. 107(Pt B). P. 2484–2491.

70. Portnyagina O.Yu., Golotin V.A., Zelepuga E.A. et al. Nonspecific porins of *Yersinia pseudotuberculosis* as inducers of experimental hyperthyroidism in mice // Bull. Exp. Biol. Med. 2018. V. 166, № 12. P. 714–717 (in Russian).

Authors

G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences. Prospect 100-let Vladivostok, 159, Vladivostok 690022, Russian Federation.

Olga Daniilovna Novikova. Chief Researcher. Doctor of Chemical Sciences.

Olga Yurievna Portnyagina. Senior Researcher. Candidate of Biological Sciences.

Olga Pavlovna Vostrikova. Senior Researcher. Candidate of Chemical Sciences.

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Pacific State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation (FSBEI HE PSMU MOH Russia), Prospect Ostryakova, 2, Vladivostok, 690002, Russian Federation.

Viktoria Alerandrovna Ivanis. Professjr. Doctor of Medicine.

Contact information for all authors: novolga_05@mail.ru

Contact person: Olga Daniilovna Novikova; novolga_05@mail.ru