

На правах рукописи



Белозёров Владислав Сергеевич

**МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МАКРОФАГОВ J774 С
КЛЕТКАМИ ИЕРСИНИЙ, ОЦЕНЕННЫЕ МЕТОДОМ АТОМНО-
СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ**

1.5.5. – Физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Киров – 2023

Работа выполнена на базе Института биологии и биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Вятский государственный университет» (ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет») Министерства науки и высшего образования Российской Федерации и лаборатории физиологии микроорганизмов Института физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук» (ИФ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН) Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Научный руководитель: **Бывалов Андрей Анатольевич**, доктор медицинских наук, профессор, ИФ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, заведующий лабораторией физиологии микроорганизмов; ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, старший научный сотрудник Центра превосходства «Фармацевтическая биотехнология».

Официальные оппоненты: **Носков Анатолий Николаевич**, доктор биологических наук, Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации, руководитель группы клостридиозов лаборатории иммунобиотехнологии (Москва).

Никифоров Алексей Константинович, доктор биологических наук, профессор, Федеральное казенное учреждение науки «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, заместитель директора по экспериментальной и производственной работе (Саратов).

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова» Министерства сельского хозяйства Российской Федерации (Саратов).

Защита диссертации состоится 11 октября 2023 г. в 14:00 часов на заседании диссертационного совета Д 004.038.01 в ИФ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН Министерства науки и высшего образования Российской Федерации по адресу 167982, Республика Коми, г. Сыктывкар, ГСП-2, ул. Первомайская, д. 50, nivarlam@physiol.komisc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук» по адресу: Сыктывкар, Коммунистическая 24 и на сайте <http://www.physiol.komisc.ru/>

Автореферат разослан « _____ » _____ 2023 года

Учёный секретарь диссертационного совета



Варламова Н.Г.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТ

Актуальность исследования. Одним из перспективных методов борьбы с бактериальными инфекциями является использование агентов, нарушающих способность бактерий прикрепляться к тканям хозяина, поскольку такая адгезия является одним из начальных этапов инфекционного процесса (Ofek et al., 2003). Адгезия и последующие стадии инвазии патогена приводят к нарушению физиологических функций у макроорганизма на молекулярном, клеточном, тканевом, органном и организменном уровнях. Изучение механизмов взаимодействия патогена, в частности отдельных его антигенов, с поверхностью клеток хозяина позволяет оценить вклад этих молекул в процесс адгезии. Такие знания клеточной физиологии позволяют разрабатывать или совершенствовать средства и методы антиадгезионной терапии.

С начала 1990-х годов число случаев заболевания чумой, вызванной бактериями *Yersinia pestis*, растёт, и вспышки заболевания вновь регистрируются в различных странах. Поэтому чуму относят к категории вновь возникающих заболеваний (Galimand et al., 2006). Другими опасными для человека микроорганизмами из рода *Yersinia* являются *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*, вызывающие псевдотуберкулез и кишечный иерсиниоз, соответственно (Mikula et al., 2012). Согласно данным Европейского центра профилактики и контроля заболеваний, средняя заболеваемость инфекциями, вызванными *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*, для 29 стран Евросоюза и Европейской экономической зоны за 2019 год составила 1,7 случая на 100 тыс. населения. В Российской Федерации, согласно данным Министерства здравоохранения РФ, заболеваемость иерсиниозом неравномерная и для некоторых регионов, таких как Сибирь и Дальний Восток, может достигать нескольких десятков случаев на 100 тыс. населения.

Степень разработанности темы исследования. Для бактерий рода *Yersinia* было установлено наличие как минимум 15 поверхностных структур, которые принимают участие в процессе адгезии патогена к клеткам хозяина. К молекулам адгезии принято относить липополисахариды (ЛПС), а также белки Ail, Psa, порины OmpF, OmpC, инвазин и другие (Mikula et al., 2012; Бывалов и др., 2019). Данные адгезины могут проявлять свои свойства на разных стадиях инфекционного процесса и в разных условиях, дополняя друг друга (Mikula et al., 2012; Бывалов, Конышев, 2019).

Для изучения процесса адгезии микроорганизмов в настоящее время всё чаще используются биофизические подходы, в частности, атомно-силовая микроскопия (АСМ) (Neuman, Nagy, 2008). АСМ позволяет проводить исследования как в воздушной, так и в жидкой среде, позволяя изучать явления, происходящие на молекулярном уровне, при физиологических условиях (Drake et al., 1989; Bustamante et al., 1997). Несмотря на то, что данный метод нашёл широкое распространение при изучении межмолекулярных взаимодействий (Gunning et al., 2016; Hoffmann et al., 2011; Zuttion et al., 2018), роль адгезинов бактерий рода *Yersinia*, а также физиологические механизмы их взаимодействия с поверхностью клеток этим методом практически не изучены.

Цель исследования: оценить функциональную значимость поверхностных антигенов бактерий рода *Yersinia* в их адгезивности к эукариотическим клеткам методом атомно-силовой микроскопии.

В связи с поставленной целью были сформулированы следующие задачи:

1. оценить эффективность критериев оценки силы межмолекулярного взаимодействия на модельной системе “липополисахарид *Y. pseudotuberculosis* – моноклональные антитела” методом атомно-силовой микроскопии;

2. оценить вклад неспецифических компонентов в изучаемое с помощью атомно-силовой микроскопии взаимодействие липополисахарида иерсиний с комплементарными антителами;

3. изучить влияние скорости нагружения межмолекулярной связи и времени контакта молекул на определяемые силовые характеристики взаимодействия на модельной системе «мышинные антитела - антимышинные антитела»;

4. определить условия иммобилизации макрофагов J774 на поверхности стекла с использованием глутарового альдегида для оценки силовых характеристик взаимодействия бактериальных антигенов с поверхностью клеток;

5. выявить функциональную роль липополисахарида *Y. pestis EV* и *Y. pseudotuberculosis* 1b, поринов OmpF и OmpC *Y. pseudotuberculosis*, белков Ail и Psa *Y. pestis* в адгезивности иерсиний к макрофагам J774 методом атомно-силовой микроскопии;

6. установить вклад клеточных рецепторов TLR4 и CD14 в регистрируемую силу связывания липополисахарида *Y. pestis EV* с поверхностью иммобилизованных клеток линии J774 путём блокировки указанных рецепторов специфическими моноклональными антителами.

Научная новизна исследования. В ходе проведённых исследований были определены условия осуществления силовой спектроскопии с использованием АСМ на модельной системе “ЛПС *Y. pseudotuberculosis* – моноклональные антитела”, разработаны критерии программной выбраковки силовых кривых, показана эффективность применения совокупности критериев оценки силы взаимодействия бактериальных антигенов с иммобилизованными на стекле макрофагами J774. Установлен вклад неспецифической составляющей в силу межмолекулярного взаимодействия ЛПС с моноклональными антителами. Определены условия эффективной иммобилизации клеток J774 на стекле с использованием глутарового альдегида для проведения силовой спектроскопии. С помощью АСМ была показана роль липополисахаридов *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis*, поринов OmpF и OmpC *Y. pseudotuberculosis*, а также белков Ail и Psa *Y. pestis* в адгезии иерсиний к макрофагам J774. Установлен вклад рецепторов TLR4 и CD14 в процесс связывания липополисахарида *Yersinia pestis EV* с поверхностью макрофагов J774.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные результаты исследования имеют важное научно-практическое значение для понимания на молекулярном уровне взаимодействий, возникающих в процессе адгезии бактерий рода *Yersinia* к эукариотическим клеткам. Апробированные

методические подходы к проведению силовой спектроскопии методом атомно-силовой микроскопии на модельных системах «антиген – антитело» и «антиген – эукариотическая клетка» могут быть востребованы при разработке антиадгезивных препаратов, предназначенных для профилактики и терапии бактериальных заболеваний.

Настоящее исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект № 20-34-90013).

Методология и методы исследования. Силовые характеристики межмолекулярного взаимодействия оценивались методом атомно-силовой микроскопии с использованием программного обеспечения Nova_Px_3.4.0, а также программ, разработанных с участием автора. Функционализацию минеральных поверхностей зонда и подложки биологически активными молекулами производили с использованием химических методов иммобилизации. Верификацию факта функционализации проводили с использованием иммуноферментного анализа и сканирующей электронной микроскопии. Статистическую обработку данных осуществляли с использованием программного пакета LibreOffice Calc 6.1.5.

Положения, выносимые на защиту:

1. На модельной системе “ЛПС *Y. pseudotuberculosis* – моноклональные антитела” показана эффективность применения выбранных критериев оценки силы межмолекулярного взаимодействия, оцениваемого методом атомно-силовой микроскопии.

2. На модельной системе «мышинные антитела - антимышинные антитела» установлено, что с повышением скорости нагружения межмолекулярной связи и времени контакта сенсibilизированных зонда и субстрата увеличивается регистрируемая сила межмолекулярных взаимодействий.

3. Оценены силовые характеристики взаимодействия бактериальных антигенов иерсиний (липополисахаридов, поринов OmpF и OmpC, адгезинов Ail и Psa) с поверхностью макрофагов J774, иммобилизованных на стекле с помощью глутарового альдегида.

Внедрение. Полученные результаты внедрены в виде методических указаний “Методы поддержания перевиваемых клеточных линий позвоночных” для сотрудников НОЦ “Нанотехнологии” Вятского государственного университета (акт внедрения от 06.02.2023г.).

Степень достоверности и апробация работы. Достоверность полученных результатов подтверждается большой выборкой экспериментальных данных, обработанных с использованием общепринятых методов статистического анализа.

Основные результаты диссертации были изложены на XVIII Всероссийской научно-практической конференции “Общество. Наука. Инновации.” (Киров, 2018), IV Всероссийской конференции “Фундаментальная гликобиология” (Киров, 2018), XIX Всероссийской научно-практической конференции “Общество. Наука. Инновации.” (Киров, 2019), XX Всероссийской научно-практической конференции “Общество. Наука. Инновации.” (Киров, 2020), VII Международной конференции молодых ученых: биофизиков,

биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов (Кольцово, 2020), XXI Всероссийской научно-практической конференции “Общество. Наука. Инновации.” (Киров, 2021).

Личный вклад автора. Основные результаты получены автором самостоятельно. Материалы, вошедшие в представленную работу, обсуждались и публиковались совместно с научным руководителем и сотрудниками лаборатории физиологии микроорганизмов Института физиологии Коми НЦ УрО РАН (г. Киров) и НОЦ “Нанотехнологии” ВятГУ (г. Киров). Выводы сделаны на основе собственных оригинальных данных. Микробиологические, иммунохимические исследования проводились совместно с доцентом кафедры биотехнологии ВятГУ Дудиной Л.Г., работа с перевиваемыми клеточными культурами – совместно с доцентом кафедры биотехнологии ВятГУ Конышевым И.В., атомно-силовая микроскопия – совместно с руководителем НОЦ «Нанотехнологии» Ананченко Б.А. Выделение поринов OmpF и OmpC производилось сотрудниками лаборатории молекулярных основ антибактериального иммунитета Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова (г. Владивосток). Выделение препаратов Ail и Psa производилось сотрудниками лаборатории микробиологии чумы ФБУН Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии (п. Оболенск). Флуоресцентная и конфокальная микроскопия проводилась совместно с сотрудниками Центра аналитической биофотоники и инженерии клеточной поверхности Института фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета (г. Казань).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 16 печатных работ, включая 4 статьи, входящие в базы данных Scopus и WOS, 12 публикаций в сборниках статей и материалов конференций, входящих в базу РИНЦ.

Соответствие паспорту научной специальности. Диссертация соответствует следующим областям паспорта специальности 1.5.5. – физиология человека и животных, биологические науки:

3. Исследование закономерностей функционирования основных систем организма (иммунной).

6. Изучение механизмов функционирования клеток, тканей, органов, принципов их системной организации.

10. Разработка новых методов исследований функций животных и человека.

11. Изучение молекулярной и интегративной организации физиологических функций.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из введения, трёх глав, заключения, выводов и списка литературы. В заключении сформулированы основные выводы по полученным результатам. Библиографический список включает 200 наименований, из них 9 отечественных и 191 иностранная. Работа изложена на 131 странице машинописного текста, содержит 15 рисунков и 12 таблиц.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю - доктору медицинских наук Бывалову А.А. профессору кафедры

биотехнологии ВятГУ за высококвалифицированный подход к организации научной деятельности и всестороннюю поддержку в проведении исследований; сотрудникам лаборатории физиологии микроорганизмов Института физиологии Коми НЦ УрО РАН (г. Киров), НОЦ “Нанотехнологии” ВятГУ (г. Киров) и Института фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета (г. Казань) за помощь в проведении исследований; коллективам лаборатории молекулярных основ антибактериального иммунитета Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН и лаборатории микробиологии чумы ФБУН Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии за предоставленные препараты бактериальных антигенов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе представлен обзор литературы, содержащий краткую информацию о бактериях рода *Yersinia* и их основных поверхностных антигенах. Кратко охарактеризованы наиболее информативные биофизические подходы для оценки силовых характеристик межмолекулярного взаимодействия. Приведено подробное описание устройства и принципа работы атомно-силового микроскопа (АСМ), указаны основные методы калибровки и функционализации кантилеверов (АСМ-зондов). Рассмотрены основные критерии, применяемые для оценки силы межмолекулярного взаимодействия, и условия эксперимента, влияющие на эту силу. Приведён обзор результатов экспериментальных исследований, в которых оцениваются силовые характеристики межмолекулярного взаимодействия на молекулярном, субклеточном и клеточном уровнях с использованием атомно-силовой микроскопии.

МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. Исследования по оценке силовых характеристик взаимодействия бактериальных антигенов с поверхностью макрофагов J774 (Российская коллекция клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН) проводили с использованием атомно-силовой микроскопии (АСМ). Для функционализации поверхности кантилевера использовались следующие препараты: козы антимышиные антитела, меченные FITC, ЛПС-EV, белки Ail и Psa *Y. pestis*, а также ЛПС-10, порины OmpF и OmpC *Y. pseudotuberculosis*. Поверхность слюды была покрыта моноклональными антителами двух типов: МКАт2, комплементарными O-боковым цепям ЛПС (Byvalov et al., 2014), и МКАт7, комплементарными белковому эпитопу внешней мембраны *Y. pseudotuberculosis* (Byvalov et al., 2015).

Функционализация поверхностей слюды и кантилевера. Процедура функционализации поверхностей зонда и слюды описана в работе (Ananchenko et al., 2020). Верификацию факта функционализации проводили с

использованием АСМ, сканирующей электронной микроскопии и твердофазного иммуоферментного анализа.

Работа с клеточными культурами. Макрофаги линии J774 выращивались в культуральных флаконах (Jet Biofil, Китай) с жидкой питательной средой DMEM (БиолоТ, Россия) в CO₂-инкубаторе (5% CO₂, 37°C). Для проведения АСМ клетки переносили на покровные стёкла и культивировали при указанных выше условиях в течение 18 ч.

Блокировка клеточных рецепторов TLR4 и CD14. Покровные стёкла с клетками линии J774 трёхкратно отмывались питательной средой DMEM с последующей инкубацией в этой же среде с блокирующим агентом: моноклональными антителами к рецепторам TLR4 или CD14, их смесью, или липополисахаридом *Y. pestis*. Клетки помещали в CO₂-инкубатор на 30 минут (5% CO₂, 37°C). После инкубации производилась трёхкратная отмывка клеток фосфатным буферным раствором (ФБР) от несвязавшихся антител или ЛПС. Блокированные клетки фиксировали на поверхности стекла 0,1%-ным раствором глутарового альдегида (ГА) в течение 30 минут с последующей 3-х кратной отмывкой ФБР.

Силовая спектроскопия. Силовая спектроскопия проводилась на базе атомно-силового микроскопа “Ntegra Prima” (NT-MDT, Россия). Сила взаимодействия оценивалась с использованием кантилеверов PNP-DB (NanoWorld, Швейцария) с радиусом закругления зонда ~10 нм. Образец подводили к кантилеверу до момента контакта, после истечения фиксированного времени контакта образец отводили от кантилевера. Во время данного процесса происходила запись силовой кривой в координатах «сигнал фотодетектора - смещение пьезостолика», по которой проводили оценку силовых характеристик взаимодействия.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Апробация критериев оценки силы межмолекулярных взаимодействий

В качестве основных критериев оценки силы межмолекулярного взаимодействия использовались: амплитуда первого отрыва; амплитуда последнего отрыва; дистанция, на которой произошёл последний отрыв; работа, которую необходимо совершить для разрыва всех связей; длина ассоциата; средняя амплитуда всех отрывов; максимальная адгезия; среднее количество отрывов на одну силовую кривую; количество силовых кривых, имеющих как минимум один разрыв связей. Эффективность этих критериев была показана для анализа взаимодействий в модельных системах «антиген – антитело» и «антиген – макрофаг».

Изучение вклада специфической и неспецифической компоненты во взаимодействие «ЛПС – МКАт2»

В исследовании вклада специфической и неспецифической составляющих в оцениваемые взаимодействия использовались кантилеверы двух типов: чистый и функционализированный ЛПС-10. В качестве подложки использовалась чистая слюда, слюда, аминированная с помощью АРТЕS, а также аминированная слюда с последующей обработкой глутаровым альдегидом. На слюду, обработанную ГА, наносили моноклональные антитела МКАт2 или МКАт7. Результаты силовой спектроскопии представлены в таблице 1, а также в виде диаграмм для силы разрыва последней связи и работы сил адгезии (рисунки 1 и 2).

Взаимодействие чистой минеральной поверхности зонда с различными вариантами слюды являются маловыраженным в сравнении с таковым для функционализированного кантилевера. Аминирование слюды, так же как и последующая обработка аминированной слюды ГА приводит к резкому увеличению ($p > 0,99$) регистрируемой силы связи и усложнению регистрируемого сигнала для ЛПС-кантилевера.

Последующая обработка слюды, покрытой последовательно АРТЕS и ГА, моноклональными антителами приводит к значительному снижению регистрируемой адгезии ($p > 0,99$). Этот факт может указывать на экранирование антителами неспецифического связывания ЛПС с альдегидными и/или аминными группами модифицированной слюды. Полученные данные силовой спектроскопии указывают на различия в силовых характеристиках между взаимодействиями в системах “ЛПС - МКАт2” и “ЛПС - МКАт7”. Существенная разница в адгезивности ЛПС-кантилевера к слюде, покрытой комплементарными и гетерологичными антителами, свидетельствует о существенном вкладе специфической составляющей во взаимодействие “ЛПС - МКАт2”.

На рисунках 1 и 2 приведены диаграммы, характеризующие силы разрыва последней связи и работы сил адгезии, соответственно, для всех 10 взаимодействующих пар. Применительно к чистому кантилеверу влияние процедур обработки слюды на определяемую силу взаимодействия существенно ниже, чем для кантилевера, функционализированного ЛПС. Обращает на себя внимание аналогичный характер данных для обоих параметров. В частности, наблюдаются более высокие показатели силовых характеристик для специфического взаимодействия “ЛПС - МКАт2”, чем для неспецифического “ЛПС - МКАт7”.

Таблица 1 – Влияние метода обработки слюды на силовые характеристики ее взаимодействия с кантилеверами «чистым» и функционализированным ЛПС *Y. pseudotuberculosis*

Кантилевер	Слюда	Показатели, $X_{cp} \pm I_{99}$										Количество опытов*
		Сила последнего отрыва, нН	Работа сил адгезии, Дж $\times 10^{-15}$	Средняя сила всех отрывов, нН	Максимальная адгезия, нН	Длина ассоциата, нм	Дистанция последнего отрыва, нм	Среднее количество отрывов	Количество отведений с отрывами, %			
«Чистый»	Чистая	1,078± 0,132	0,12± 0,02	1,078± 0,132	1,148± 0,106	0,7± 0,4	18,6± 2,2	1,00± 0,00	65,5	55		
	АРТЕС	1,051± 0,260	0,20± 0,08	1,042± 0,208	1,097± 0,248	13,2± 9,8	30,7± 10,7	1,30± 0,21	100,0	44		
	ГА	0,926± 0,506	0,16± 0,19	1,063± 0,447	0,963± 0,501	7,5± 6,2	22,9± 12,3	1,42± 0,67	80,0	12		
Функцио- нализиро- ванный ЛПС	МКАг2	0,686± 0,184	0,16± 0,09	0,778± 0,168	0,852± 0,207	20,3± 6,8	31,7± 7,9	1,46± 0,30	51,3	41		
	МКАг7	0,585± 0,187	0,11± 0,05	0,602± 0,150	0,655± 0,174	18,6± 5,2	28,3± 6,7	1,28± 0,21	43,3	58		
	Чистая	0,538± 0,035	0,10± 0,02	0,547± 0,034	0,627± 0,033	12,2± 3,9	21,1± 4,0	1,10± 0,03	73,5	887		
Функцио- нализиро- ванный ЛПС	АРТЕС	1,876± 0,302	1,28± 0,32	2,117± 0,232	2,365± 0,322	103,7± 34,5	134,9± 33,5	1,82± 0,20	93,6	189		
	ГА	5,461± 0,375	6,05± 0,61	5,199± 0,220	6,032± 0,379	77,0± 5,2	167,8± 8,9	2,76± 0,19	99,3	283		
	МКАг2	2,267± 0,211	2,66± 0,45	2,650± 0,161	2,383± 0,215	85,3± 6,6	123,0± 9,6	1,96± 0,12	78,0	1089		
Функцио- нализиро- ванный ЛПС	МКАг7	1,169± 0,134	0,59± 0,16	1,447± 0,124	1,251± 0,129	33,4± 4,0	52,8± 5,6	1,53± 0,08	72,5	981		

Примечание: 1. I_{99} - доверительный интервал ($r=0,99$).

2. * - Представлено количество результирующих (после выбраковки) силовых кривых

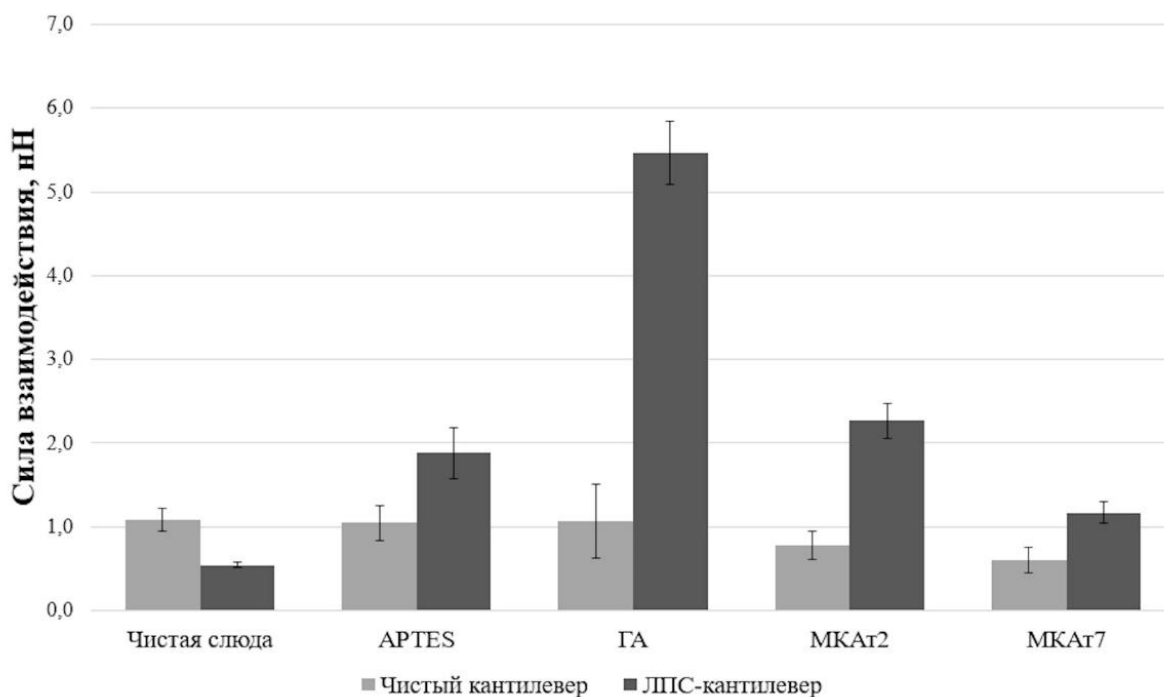


Рисунок 1 - Средняя сила разрыва последней связи. Доверительные интервалы указаны для $p=0,99$

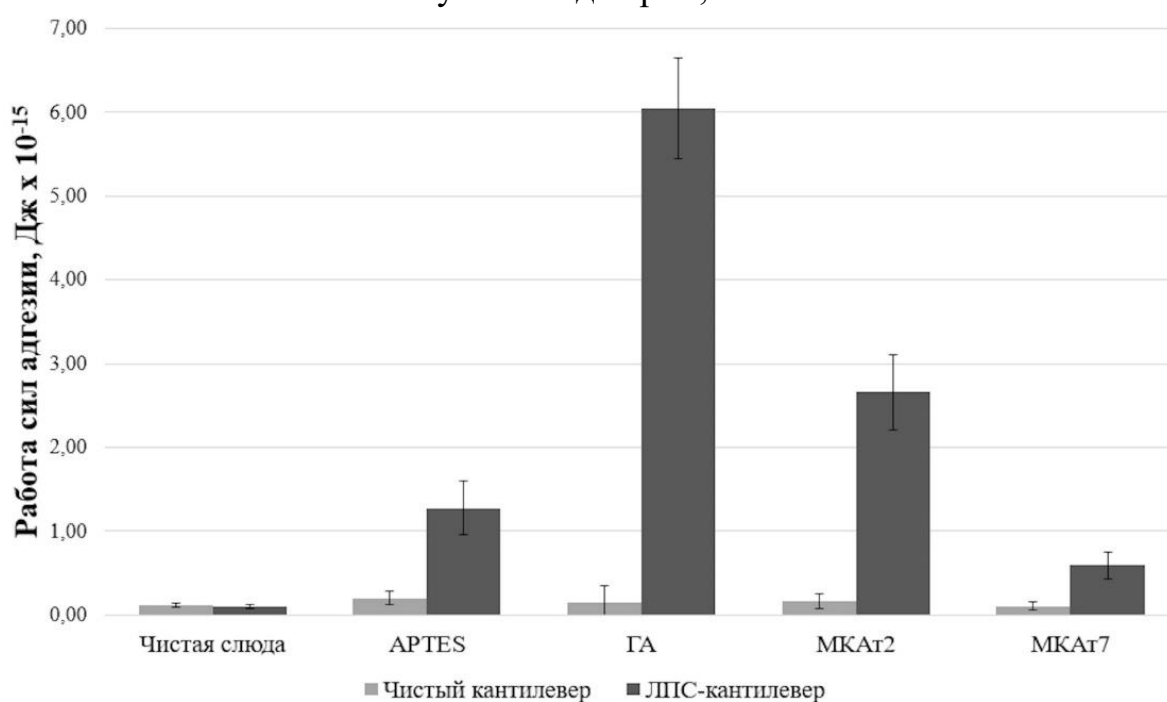


Рисунок 2 - Площадь между кривыми подведения и отведения (работа сил адгезии). Доверительные интервалы указаны для $p=0,99$

Совокупность представленных экспериментальных данных свидетельствует о том, что неспецифическое связывание может быть вызвано не столько влиянием минеральных поверхностей, сколько молекулами, используемыми для модификации и функционализации этих поверхностей.

Оценка влияния времени контакта на определяемую силу взаимодействия в модельной системе «мышинные антитела – антимышинные антитела»

Для более точного понимания процесса взаимодействия молекул при различных условиях проведения эксперимента была использована модельная система “МКАт7 - антимышинные антитела”. Было показано, что увеличение времени контакта сенсibilизированных поверхностей приводит к увеличению силы связывания. Например, увеличение времени контакта с 1 до 60 секунд приводит к увеличению ($p > 0,99$) силы разрыва последней связи с $0,504 \pm 0,050$ до $0,601 \pm 0,061$ нН. Данный эффект предположительно связан, во-первых, с увеличением количества образующихся связей, во-вторых, с процессом насыщения межмолекулярных связей и, в-третьих, с тем, что большее время контакта позволяет молекулам ближе подойти друг к другу в пространстве (Li et al., 2013; Hoffmann et al., 2011, Wickham et al., 1990). Это также подтверждается увеличением среднего количества разрывов связей на силовую кривую с $1,30 \pm 0,13$ до $2,25 \pm 0,23$ и увеличением вероятности связывания с 50,8 до 88,4%.

Оценка влияния скорости нагружения межмолекулярной связи на силовые характеристики на модельной системе «мышинные антитела – антимышинные антитела»

Для оценки влияния скорости нагружения межмолекулярной связи на силовые характеристики использовалась модельная система “МКАт7 - антимышинные антитела”, на которой определялись силовые характеристики при трёх значениях скорости нагружения связи - 6, 30 и 60 нН/с.

Уменьшение скорости нагружения межмолекулярной связи с 60 до 6 нН/с приводит к снижению значений регистрируемых показателей. Сила разрыва последней связи снизилась с $0,536 \pm 0,072$ до $0,306 \pm 0,029$ нН, а работа сил адгезии с $0,42 \pm 0,07 \times 10^{-15}$ до $0,15 \pm 0,03 \times 10^{-15}$ Дж. Предположительно, снижение определяемых силовых характеристик может быть связано с увеличением времени, затраченного на разрушение образовавшейся межмолекулярной связи - у молекул появляется больше времени для изменения своего положения в пространстве, что позволяет им в момент разрыва связи находиться в состоянии, приближенном к равновесному (Zhang et al., 2002).

Роль поверхностных антигенов иерсиний в их адгезии к макрофагам J774

В качестве сенситинов, размещаемых на зонде, в данном исследовании использовались препараты липополисахаридов ЛПС-EV и ЛПС-10, порины OmpF и OmpC, а также белки Ail и Psa. В качестве контроля использовался бычий сывороточный альбумин (БСА). Фиксация клеток J774 производилась по установленным ранее условиям: 30-минутная обработка в 0,1%-ном растворе глутарового альдегида. В таблице 2 (равно как и в таблице 3) представлены данные силовой спектроскопии, из которых исключены силовые кривые, содержащие отрывы свыше 1 нН.

Результаты эксперимента (таблица 2) показывают, что порины могут взаимодействовать с поверхностью клеток J774 на таком же уровне, как и липополисахарид. Достоверные различия в силовых характеристиках наблюдаются между препаратом ЛПС-EV и обоими поринами по параметру работа сил адгезии ($p > 0,99$), а также для группы сравнения «ЛПС-EV - OmpC» по силе разрыва последней связи ($p > 0,95$). Для группы сравнения «ЛПС-10 - OmpF» показано, что порин OmpF характеризуется более выраженным взаимодействием с клеточной поверхностью, чем ЛПС-10, по критерию работа сил адгезии ($p > 0,99$). Различий между поринами OmpF и OmpC установлено не было.

Для адгезинов Ail и Psa были зарегистрированы существенно меньшие ($p > 0,99$) силы взаимодействия в сравнении с другими препаратами по показателям силы отрывов (последнего, первого и всех отрывов). Стоит отметить, что значения таких параметров взаимодействия, как количество отведений с отрывами и среднее количество отрывов на одной хронограмме отведения для препаратов Ail и особенно Psa оказались выше, чем для препаратов поринов и липополисахаридов (таблица 2). Вместе с тем, вероятность взаимодействия (количество отведений с отрывами, таблица 2) белков Ail и Psa составила 31,3 и 55,1 %, соответственно, и превысила значение этого показателя не только для БСА, но и для препаратов поринов и ЛПС.

Таблица 2 – Силовые характеристики взаимодействия бактериальных антигенов с поверхностью клеток J774 (фильтрация данных - 1нН)
($X_{mean} \pm I_{99}$)

Антиген	Сила последнего отрыва, нН	Работа сил адгезии, Дж $\times 10^{-15}$	Средняя сила всех отрывов, нН	Сила первого отрыва, нН	Длина ассоциата, нм	Количество отрывов	Количество отведений с отрывами, %	Количество опытов
ЛПС-EV	0,587 \pm 0,073	0,22 \pm 0,09	0,583 \pm 0,073	0,580 \pm 0,076	178,2 \pm 120,0	1,04 \pm 0,06	11,6	73
ЛПС-10	0,548 \pm 0,073	0,26 \pm 0,14	0,536 \pm 0,068	0,545 \pm 0,075	213,1 \pm 105,6	1,14 \pm 0,11	10,4	79
OmpF	0,536 \pm 0,033	0,51 \pm 0,13	0,538 \pm 0,029	0,545 \pm 0,034	136,8 \pm 36,1	1,23 \pm 0,09	26,1	314
OmpC	0,508 \pm 0,051	0,38 \pm 0,11	0,507 \pm 0,041	0,528 \pm 0,050	84,5 \pm 31,9	1,22 \pm 0,11	21,5	174
Ail	0,382 \pm 0,056	0,27 \pm 0,06	0,387 \pm 0,042	0,354 \pm 0,049	238,1 \pm 42,7	1,49 \pm 0,16	31,3	302
Psa	0,278 \pm 0,028	0,38 \pm 0,07	0,300 \pm 0,021	0,300 \pm 0,026	262,2 \pm 34,6	1,61 \pm 0,12	55,1	360
BCA	0,482 \pm 0,032	0,81 \pm 0,11	0,482 \pm 0,027	0,485 \pm 0,034	172,1 \pm 41,2	1,22 \pm 0,09	22,0	365

Примечание: I_{99} - доверительный интервал ($p=0,99$).

Оценка вклада рецепторов TLR4 и CD14 в силу взаимодействия ЛПС с макрофагами J774

Оценка силовых характеристик осуществлялась между препаратом ЛПС-EV, расположенным на кантилевере, и интактной поверхностью клеток J774, а также поверхностью этих клеток с заблокированными рецепторами TLR4 и/или CD14. Экранирование рецепторов осуществлялась с использованием коммерческих препаратов мышинных моноклональных антител и препарата ЛПС-EV. Наличие указанных рецепторов на поверхности клеток J774 было подтверждено результатами флуоресцентной и конфокальной микроскопии.

Данные силовой спектроскопии представлены в таблице 3. Блокировка рецепторов TLR4 на поверхности иммобилизованных клеток J774 специфическими моноклональными антителами привела к значительному ($p > 0,99$) снижению силовых характеристик, в частности, силы первого и последнего отрывов, средней силы всех отрывов, а также работы сил адгезии, в сравнении с интактными клетками. В целом, аналогичное, но немногим менее выраженное ослабление сил связи по оцениваемым параметрам зарегистрировано для клеток J774 с заблокированным моноклональными антителами рецептором CD14, за исключением амплитуды первого и последнего отрывов. Для указанных параметров различия между заблокированными и интактными клетками достоверны с вероятностью 94.1 и 95.8 %, соответственно. Роль рецепторов в связывании липополисахарида косвенно подтверждается их блокировкой препаратом ЛПС *Y. pestis EV*. Эти результаты подтверждают ранее опубликованные данные (Matsuura et al., 2010), свидетельствующие о способности ЛПС взаимодействовать с рецептором TLR4 в составе клеточной стенки без предварительного связывания с рецептором CD14. Следует также отметить, что каждый из трех вариантов блокировки (с помощью ЛПС, а также моноклональных антител к CD14 и TLR4) приводит к снижению вероятности связывания сенсibilизированного липополисахаридом зонда с клеточной поверхностью, на что указывает сокращение «количества отведений с отрывами» (таблица 3).

Таблица 3 – Силовые характеристики взаимодействия ЛПС-EV с поверхностью клеток J774 (фильтрация данных - 1nN) ($X_{\text{mean}} \pm I_{99}$)

Клеточная поверхность	Сила последнего отрыва, нН	Работа сил адгезии, Дж $\times 10^{-15}$	Средняя сила всех отрывов, нН	Сила первого отрыва, нН	Длина ассоциата, нм	Количество отрывов	Количество отведений с отрывами, %	Количество опытов
J774	0,216 \pm 0,031	0,31 \pm 0,06	0,253 \pm 0,020	0,254 \pm 0,033	396,5 \pm 61,6	2,13 \pm 0,20	57,0	325
J774+anti-TLR4	0,164 \pm 0,029	0,20 \pm 0,06	0,190 \pm 0,020	0,203 \pm 0,031	486,8 \pm 83,0	2,06 \pm 0,27	47,9	277
J774+anti-CD14	0,183 \pm 0,033	0,19 \pm 0,05	0,210 \pm 0,018	0,218 \pm 0,031	425,1 \pm 72,0	2,14 \pm 0,19	44,2	282
J774+anti-TLR4+anti-CD14	0,195 \pm 0,041	0,19 \pm 0,05	0,186 \pm 0,022	0,211 \pm 0,040	451,7 \pm 90,8	1,80 \pm 0,20	39,2	204
J774+ЛПС-EV	0,189 \pm 0,043	0,17 \pm 0,07	0,187 \pm 0,029	0,201 \pm 0,041	428,5 \pm 95,9	1,67 \pm 0,25	31,1	183

Примечание: I₉₉ - доверительный интервал (p=0,99).

ВЫВОДЫ

1. На модельной системе «ЛПС *Y. pseudotuberculosis* - моноклональные антитела» с использованием разработанных критериев выбраковки силовых кривых и критериев оценки силы связи предложен способ изучения физиологических механизмов взаимодействия в модельных системах «антиген – антитело» и «антиген – эукариотическая клетка» методом атомно-силовой микроскопии.

2. На модельных системах «антиген – антитело» и «антиген – макрофаг J774» установлен значительный вклад неспецифического связывания в регистрируемую силу межмолекулярного взаимодействия. Неспецифическая составляющая взаимодействия может определяться физико-химическими свойствами взаимодействующих молекул и условиями проведения силовой спектроскопии.

3. На модельной системе “мышинные антитела - антимышинные антитела” показано увеличение регистрируемой силы взаимодействия при повышении скорости нагружения межмолекулярной связи и времени контакта молекул.

4. Для оценки силовых характеристик взаимодействия бактериальных антигенов с поверхностью макрофагов J774 экспериментально обоснованы условия их иммобилизации на поверхности стекла путем инкубации в 0,1 % растворе глутарового альдегида в течение 30 мин.

5. Оценены силовые характеристики взаимодействия поверхностных антигенов иерсиний с иммобилизованными клетками линии J774. Показано, что значения таких показателей взаимодействия с мембраной макрофагов, как сила последнего и первого отрывов, а также средняя сила всех отрывов для белков Ail и Psa существенно ниже по сравнению с препаратами липополисахаридов *Yersinia pseudotuberculosis 1b* и *Yersinia pestis EV*, а также поринов OmpF и OmpC *Yersinia pseudotuberculosis*. Относительно более высокие значения показателей среднего количества отрывов и количества отведений с отрывами свидетельствуют о наличии специфической компоненты в исследуемых взаимодействиях антигенов Ail и Psa с макрофагами J774.

6. Определены силовые характеристики взаимодействия липополисахарида *Yersinia pestis EV* с клетками J774, поверхность которых была обработана специфическими моноклональными антителами к рецепторам TLR4 и CD14. Установлено, что блокировка указанных рецепторов приводит к снижению регистрируемой силы связывания макрофагов с липополисахаридом *Yersinia pestis EV*, что подтверждает значимость этого антигена в механизмах формирования специфического и неспецифического иммунитета.

Практические рекомендации

Полученные данные силовой спектроскопии рекомендуется использовать при разработке новых подходов для изучения физиологических механизмов первичной адгезии микроорганизмов к клеткам хозяина.

Результаты и выводы диссертации рекомендуется использовать при проведении исследований по разработке антиадгезивных препаратов для профилактики и терапии бактериальных заболеваний.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ Статьи в научных журналах, включённых в список Scopus и WOS:

1. Byvalov A.A. The Adhesiveness of the OmpF and OmpC Porins from *Yersinia pseudotuberculosis* to j774 Macrophages / A.A. Byvalov, I.V. Konyshev, **V.S. Belozеров**, O.D. Novikova, O.Y. Portnyagina, V.A. Khomenko, V.N. Davydova // *Biophysics*. – 2018. – V. 63. – N 5. – P. 727-734. **Scopus**.
2. Ananchenko B. Evaluation of intermolecular forces between lipopolysaccharides and monoclonal antibodies using atomic force microscopy / B. Ananchenko, **V. Belozеров**, A. Byvalov, I. Konyshev, A. Korzhavina, L. Dudina // *Int J Biol Macromol*. – 2020. – V. 156. – P. 841-850. **Scopus, WOS, PubMed**.
3. Byvalov A. Force spectroscopy of interactions between *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* cells and monoclonal antibodies using optical tweezers / A. Byvalov, I. Konyshev, B. Ananchenko, **V. Belozеров** // *European Biophysics Journal*. – 2022. – V. 51. – P. 257-264. **Scopus**.
4. Byvalov A.A. Specific and nonspecific interactions of *Yersinia pseudotuberculosis* lipopolysaccharide with monoclonal antibodies assessed by atomic force microscopy / A.A. Byvalov, **V.S. Belozеров**, B.A. Ananchenko, I.V. Konyshev // *Biophysics*. – 2022. – V. 67. – N 6. – P. 856-866. **Scopus**.

Публикации, входящие в библиографическую базу РИНЦ:

1. Конышев И.В. Отработка методических подходов к определению силы связи в системе «эукариоцит-прокариоцит» методом оптической ловушки / И.В. Конышев, **В.С. Белозеров**, А.А. Бывалов // ОБЩЕСТВО, НАУКА, ИННОВАЦИИ (НПК-2016) Сборник статей 2-е издание, исправленное и дополненное. Вятский государственный университет. 2016. – С. 117-125.
2. Konyshev I.V. A method for estimation of adhesion force in the model system «prokaryocyte - eukaryocyte» with use of optical trap / I.V. Konyshev, **V.S. Belozеров** // *Physics, Engineering and Technologies for Biomedicine The 2nd International Symposium: book of Abstracts*. National Research Nuclear University MEPHI. – 2017. – С. 222-223.
3. Конышев И.В. Современные методы биофизики, используемые для изучения микромеханики живых систем / И.В. Конышев, **В.С. Белозёров**, А.А. Бывалов // В сборнике: ОБЩЕСТВО. НАУКА. ИННОВАЦИИ (НПК-2017) сборник статей. Всероссийская ежегодная научно-практическая конференция. Вятский государственный университет. – 2017. – С. 70-79.
4. **Белозёров В.С.** Отработка метода оценки сил межмолекулярного взаимодействия на модельной системе «микросфера-микросфера» с использованием оптического пинцета / **В.С. Белозёров**, И.В. Конышев, А.А. Бывалов // *Advanced Science*. – 2017. – № 1. – 8 с.
5. **Белозёров В.С.** Оценка сил межмолекулярного взаимодействия липополисахарида *Yersinia pseudotuberculosis* с комплементарными антителами с использованием атомно-силовой микроскопии / **В.С. Белозёров**, Б.А. Ананченко, И.В. Конышев // *Общество. Наука. Инновации*. (НПК-2018), сборник статей XVIII Всероссийской научно-практической конференции. – Киров, – 2018. – Т. 1. – С. 14-19.

6. **Белозёров В.С.** Определение силы связи в системе «антиген-антитело» методом атомно-силовой микроскопии / **В.С. Белозёров**, Б.А. Ананченко, А.А. Бывалов // *Фундаментальная гликобиология. Сборник материалов IV Всероссийской конференции.* – Киров, – 2018. – С. 91.

7. **Белозеров В.С.** Способ оценки силы межмолекулярных взаимодействий в модельной системе «микросфера-микросфера» методом оптической ловушки / **В.С. Белозеров**, И.В. Коньшев, А.А. Бывалов // *Молодежь и наука на Севере. Материалы докладов III Всероссийской (XVIII) молодежной научной конференции (с элементами научной школы).* В 2-х томах. – 2018. – С. 94-95.

8. **Белозёров В.С.** Отработка метода оценки силы межмолекулярного взаимодействия в системе «антиген-антитело» с использованием атомно-силовой микроскопии / **В.С. Белозёров**, Б.А. Ананченко, И.В. Коньшев // *Общество. Наука. Инновации. (НПК-2019), сборник статей XIX Всероссийской научно-практической конференции.* – Киров, – 2019. – Т. 1. – С. 7-12.

9. **Белозёров В.С.** Силовые характеристики взаимодействия в модельной системе «антиген-антитело», оцененные методом атомно-силовой микроскопии / **В.С. Белозёров**, И.В. Коньшев, Л.Г. Дудина // *VII Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов.* – Новосибирск, – 2020. – С. 199-201.

10. **Белозёров В.С.** Влияние скорости нагружения межмолекулярных связей на определяемую силу взаимодействия в системе «антиген-антитело» с использованием атомно-силовой микроскопии / **В.С. Белозёров**, Б.А. Ананченко, И.В. Коньшев, А.А. Бывалов // *Общество. Наука. Инновации. (НПК-2020), сборник статей XX Всероссийской научно-практической конференции.* – Киров, – 2020. – Т. 2. – С. 14-18.

11. Коньшев И.В. Оценка сил межмолекулярного взаимодействия в системе «бактерия — антитело» с использованием оптической ловушки / И.В. Коньшев, **В.С. Белозёров**, Л.Г. Дудина // *VII Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов.* – Новосибирск, – 2020. – С. 240-241.

12. **Белозёров В.С.** Влияние времени фиксации макрофагов J-774 глутаровым альдегидом на силу взаимодействия в системе «липополисахарид *Yersinia pseudotuberculosis* – макрофаг J-774» с использованием атомно-силовой микроскопии / **В.С. Белозёров**, Б.А. Ананченко, И.В. Коньшев, А.А. Бывалов // *Общество. Наука. Инновации. (НПК-2021), сборник статей XXI Всероссийской научно-практической конференции.* – Киров, – 2021. – Т. 2. – С. 17-23.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

APTES	(3-Аминопропил)триэтоксисилан
CD	кластер дифференцировки
EDC	1-Этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид
NHS	N-гидроксисукцинимид
TLR	толл-подобный рецептор
АСМ	атомно-силовая микроскопия
БСА	бычий сывороточный альбумин
ГА	глутаровый альдегид
ЛПС	липополисахарид
МкАт	моноклональные антитела
СЭМ	сканирующая электронная микроскопия
ФБР	фосфатный буферный раствор

Подписано в печать 26.06.2023

Компьютерный набор. Гарнитура Times New Roman. Формат 60x90 1/16

Бесплатно. Усл. печ. л. 1,0.

Тираж 100 экз. Заказ № 0212-2023

Центр полиграфических услуг

Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Вятский государственный университет»

610000, г. Киров, ул. Преображенская, 41