

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования «Вятский государственный университет»

Институт 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»

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор Бывалов А.А.

Киров - 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ.....	2
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
1.1. Характеристика патогенных бактерий рода <i>Yersinia</i>	16
1.2. Поверхностные антигены иерсиний.....	17
1.3. Методы оценки силы взаимодействия биологических микрообъектов...	22
1.3.1. Общая характеристика метода оптической ловушки.....	23
1.3.2. Общая характеристика магнитного пинцета.....	24
1.3.3. Общая характеристика атомно-силовой микроскопии.....	25
1.3.3.1. Методы функционализации минеральных поверхностей биообъектами.....	34
1.3.3.2. Критерии оценки силовых характеристик.....	36
1.3.3.3. Факторы, влияющие на определяемую силу взаимодействия.....	38
1.3.3.4. Силовая спектроскопия единичных молекул.....	40
1.3.3.5. Силовая спектроскопия клеток.....	42
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	46
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	46
2.1. Оборудование.....	46
2.2. Используемые сенситины.....	46
2.3. Модификация поверхностей слюды и кантилевера.....	48
2.4. Функционализация кантилевера.....	48
2.5. Функционализация слюды.....	49
2.6. Работа с клеточными культурами.....	50
2.7. Блокировка клеточных рецепторов TLR4 и CD14.....	51
2.8. Сканирование поверхностей.....	51
2.9. Силовая спектроскопия.....	51
2.10. Сканирующая электронная микроскопия.....	53
2.11. Конфокальная и флуоресцентная микроскопия.....	53
2.12. Твердофазный иммуноферментный анализ.....	54

2.13. Статистическая обработка полученных результатов.....	54
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	56
3.1. Оценка силовых характеристик в модельной системе «молекула - молекула».....	56
3.1.1. Верификация факта сенсibilизации зонда и слюды.....	56
3.1.2. Обоснование критериев выбраковки силовых кривых.....	59
3.1.3. Апробация критериев оценки силы межмолекулярных взаимодействий.....	62
3.1.4. Определение силы взаимодействия ЛПС с антителами, иммобилизованными на слюде с использованием NHS и EDC.....	64
3.1.5. Изучение вклада специфической и неспецифической компоненты во взаимодействие «ЛПС – МКАт2».....	70
3.1.6. Оценка влияния времени контакта на определяемую силу взаимодействия в модельной системе «мышинные антитела – антимышинные антитела».....	77
3.1.7. Оценка влияния скорости нагружения межмолекулярной связи на силовые характеристики на модельной системе «мышинные антитела – антимышинные антитела».....	81
3.2. Оценка силовых характеристик в модельной системе «молекула - клетка».....	82
3.2.1. Обоснование выбора клеточной культуры.....	83
3.2.2. Выбор клетки для измерений методом силовой спектроскопии.....	84
3.2.3. Отработка условий фиксации клеток глутаровым альдегидом.....	85
3.2.4. Роль поверхностных антигенов иерсиний в их адгезии к макрофагам J774.....	92
3.2.5. Оценка вклада рецепторов TLR4 и CD14 в силу взаимодействия ЛПС с макрофагами J774.....	97
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	103
ВЫВОДЫ.....	106

Практические рекомендации.....	108
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	109
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	110

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Инфекционные болезни и сейчас являются глобальной проблемой современной медицины, являясь причиной смерти около трети ежегодно умирающих людей. Для большинства инфекций, в том числе и бактериального происхождения, это связано с недостаточностью имеющегося арсенала средств и методов их лечения. В этой связи, решающее значение при разработке новых подходов к терапии таких заболеваний имеет дальнейшее фундаментальное исследование физиологических процессов, происходящих в здоровом и инфицированном организме (Rajagopal et al., 2022).

В настоящее время наблюдается стремительный рост данных, описывающих физиологическое состояние клетки, структуру отдельных клеточных компонентов и их функции (Power, Huisken, 2017; Hoffman et al., 2020; Xu et al., 2021). Благодаря таким экспериментальным данным, а также методам математического моделирования, можно получить представление о том, как явления, происходящие на клеточном уровне, определяют физиологические процессы отдельных органов (Hunter et al., 2003). Такие модели на уровне отдельных клеток обеспечивают основу для характеристики ключевых механических и химических факторов, лежащих в основе протекания заболеваний (Rajagopal et al., 2022). Изучение физиологии отдельных клеток направлено на понимание фундаментальных механизмов их жизнедеятельности. В частности, подход к изучению отдельных клеток позволяет изучать механизмы, которые невозможно выявить при экспериментах на уровне клеточной популяции (Taheri-Araghi et al., 2015). В этой связи, одним из основных направлений разработки новых терапевтических средств является углубленное исследование физиологических особенностей жизнедеятельности эукариотических клеток хозяина и бактериальных клеток, в том числе в их взаимодействии.

В настоящее время одной из важнейших проблем для медицины и фармацевтики является антибиотикорезистентность бактерий. Появление новых устойчивых штаммов микроорганизмов ставит под угрозу эффективность распространённых методов лечения заболеваний с применением антибиотиков (Sengupta et al., 2013; Gould, Bal, 2013; Golkar et al., 2014; Wright, 2014). Спустя много десятилетий после того, как впервые была использована антибиотикотерапия, бактериальные инфекции снова стали угрозой здоровья человека (Ventola, 2015). Возникновение этой проблемы объясняется чрезмерным и неправильным использованием антибиотиков, а также сложностями экономического и нормативного характера, возникающими при разработке новых препаратов (Sengupta et al., 2013; Gould, Bal, 2013; Nature, 2013; Read, Woods, 2014; Piddock, 2012; Michael et al., 2014). Учитывая вышеизложенное, разработка новых методов терапии и профилактики инфекционных заболеваний становится все более актуальной.

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. В частности, адгезированные клетки получают значительно большую устойчивость как к естественному ответу иммунной системы организма, так и к медикаментозной терапии с использованием антибиотиков. Такие бактерии имеют больше возможностей для получения питательных веществ, что ещё сильнее повышает их способность к выживанию и распространению (Ofek, Doyle, 1994). Таким образом, процесс адгезии носит приспособительный характер для выживания бактерий *in vivo* и является ключевым этапом патогенеза. Антиадгезионная терапия направлена на снижение вероятности возникновения прочного контакта между патогеном и клетками организма путём блокировки молекул, отвечающих за адгезию, или снижения их активности. 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 и совершенствовать средства и методы возможного влияния тех или иных антиадгезионных агентов на силу взаимодействия в системе «эукариотическая клетка – бактериальная клетка».

С начала 1990-х годов число случаев заболевания чумой, вызванной бактериями *Yersinia pestis*, растёт, и вспышки заболевания вновь появляются 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., 2013). Согласно данным Европейского центра профилактики и контроля заболеваний, средняя заболеваемость людей, вызванная *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 с той или иной степенью экспериментального доказательства принимают участие в процессе адгезии патогена к клеткам хозяина. Данные молекулы имеют различную структуру и состав, однако по своей природе преимущественно являются белками. К молекулам адгезии принято относить липополисахариды (ЛПС), а также белковые молекулы Ail, Psa, порины OmpF, OmpC, инвазин и другие (Mikula et al., 2013; Бывалов, Коньшев, 2019). Данные адгезины могут проявлять свои свойства на разных стадиях инфекционного процесса и в разных условиях, дополняя друг

друга (Mikula et al., 2013; Бывалов, Коньшев, 2019). Изучение физиологических механизмов их взаимодействия с поверхностными структурами клетки хозяина на молекулярном и клеточном уровнях позволяет установить вклад и возможную роль каждого из антигенов в адгезивности патогена, а также оценить возможность влияния на указанные механизмы взаимодействия путём использования антиадгезионных агентов.

Для изучения процесса адгезии микроорганизмов к клеткам макроорганизма в настоящее время стали всё чаще использовать биофизические подходы, такие как оптический и магнитный пинцеты и атомно-силовая микроскопия (АСМ) (Neuman, Nagy, 2008). АСМ позволяет проводить исследования как в воздушной, так и в жидкой среде, для изучения явлений, происходящих на молекулярном уровне, в том числе 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 эукариотических клеток ранее этим методом не изучались.

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.

Во введении обоснована актуальность исследования, сформулированы цель и основные задачи, описана научная новизна и научно-практическая значимость исследования.

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

Вторая глава посвящена описанию объекта исследования и основных методов. В ней перечислены использованные в работе реактивы и оборудование, указаны методики модификации и последующей функционализации зондов и подложки, работы с клеточными культурами, проведения сканирования и силовой спектроскопии с использованием атомно-силового микроскопа. Описано применение АСМ и сканирующего электронного микроскопа для верификации факта функционализации минеральных поверхностей, используемых в экспериментах по силовой спектроскопии.

В третьей главе приводятся данные, подтверждающие факт функционализации минеральных поверхностей АСМ-зонда и подложки. Описаны критерии выбраковки силовых кривых, полученных в ходе силовой спектроскопии, а также критерии, по которым произведена оценка силы взаимодействия в

модельных системах “молекула - молекула” и “молекула - клетка”. На основе полученных результатов взаимодействия липополисахарида с антителами, а также данных, полученных для простой системы “мышинные антитела - антимышинные антитела”, была показана эффективность выбранных критериев оценки силы взаимодействия, оценен вклад неспецифической компоненты в оцениваемую силу взаимодействия и установлена зависимость регистрируемого сигнала от скорости нагружения межмолекулярной связи и времени контакта между молекулами. Приводятся обоснование выбора клеточной линии J774, условий иммобилизации этих клеток на поверхности слюды с использованием глутарового альдегида и процедура выбора клетки для последующего измерения силы формируемой связи. Получены данные силовой спектроскопии, характеризующие силу связи между антигенами клеток иерсиний и поверхностью макрофагов J774.

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; руководителю Научно-образовательного центра “Нанотехнологии” Ананченко Б.А., кандидату химических наук, за ценные теоретические и практические рекомендации при проведении исследования с использованием атомно-силовой микроскопии и помощь в изучении образцов с использованием СЭМ и АСМ; научному сотруднику Центра превосходства “Фармацевтическая биотехнология” Конышеву И.В. за помощь в работе с клеточными линиями и в проведении иммунобиологических исследований; доценту кафедры Биотехнологии ВятГУ Дудиной Л.Г. за иммунохимическую характеристику препаратов моноклональных антител; коллективу лаборатории молекулярных основ антибактериального

иммунитета Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН за предоставленные препараты поринов; коллективу лаборатории микробиологии чумы ФБУН Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии за предоставленные препараты Ail и Psa; сотрудникам Института фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета: Фахруллину Р.Ф., Конновой С.А. и Рожиной Э.В. за проведение совместных исследований по конфокальной и флуоресцентной микроскопии клеток; доценту кафедры электронных вычислительных машин ВятГУ Коржавиной А.С. за помощь в разработке программного обеспечения для обработки данных; коллективу кафедры биотехнологии ВятГУ за помощь и поддержку во время выполнения и обсуждения диссертационной работы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Млекопитающие подвержены воздействию бактериальных и вирусных агентов, вызывающих различные заболевания, дезорганизирующие нормальное функционирование систем организма. При описании инфекционного процесса выделяют несколько стадий, одной из которых является первичная адгезия патогена на тканях макроорганизма с последующим образованием биоплёнки (Verne et al., 2018). Последующие этапы взаимодействия патогена с тканями хозяина приводят к нарушению физиологических функций макроорганизма. Для разработки новых антиадгезивных средств лечения бактериальных инфекций требуется углубленное исследование на клеточном и молекулярном уровнях физиологических основ жизнедеятельности эукариотических клеток хозяина и бактериальных клеток, включая их взаимодействие. В главе 1 представлены данные литературы, касающиеся основных аспектов проблемы изучения методом атомно-силовой микроскопии механизмов адгезии бактерий рода *Yersinia* к макрофагам J774.

1.1. Характеристика патогенных бактерий рода *Yersinia*

Бактерии рода *Yersinia* относятся к семейству *Enterobacteriaceae* и являются грамотрицательными факультативными анаэробами. К настоящему времени зарегистрировано 26 различных видов рода *Yersinia* (Abdel-Glil et al., 2021), три из которых являются патогенными для человека и животных: *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis* (Mikula et al., 2013; Бывалов и др., 2017). Первые два вида являются энтеропатогенами, вызывающими широкий спектр заболеваний - от легкой диареи, энтероколита, мезентериального лимфаденита до реактивного артрита и сепсиса (Cover, Aber, 1989; Бывалов и др., 2017). Согласно данным Европейского центра профилактики и контроля заболеваний за 2019 год число случаев заболевания иерсиниозом (вызванным *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*) в 29 странах Евросоюза и Европейской экономической зоны

насчитывает несколько человек на 100000 населения. Наиболее распространены случаи заражения детей в возрасте до 4 лет, для данной возрастной группы распространённость заболевания составляет 5,9 - 7,2 случая на 100000 населения (European Centre for Disease Prevention and Control. Yersiniosis. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2019). В Российской Федерации заболеваемость псевдотуберкулёзом распределена неравномерно. Согласно данным Министерства здравоохранения РФ заболеваемость псевдотуберкулёзом может достигать для отдельных регионов нескольких десятков человек на 100000 населения.

Третий вид, *Y. pestis*, - самый вирулентный и инвазивный из трех указанных видов иерсиний, вызывающий крайне смертельное заболевание – первично-легочную, бубонную и септицемическую чуму (Perry, Fetherston, 1997). С начала 1990-х годов по настоящее время регистрируется рост заболеваемости чумой, которую поэтому относят к категории вновь возникающих инфекций (Galimand et al., 2006). Данные, собранные Всемирной организацией здравоохранения в период с 2010 по 2015 годы, указывают на высокую заболеваемость чумой в некоторых регионах Африки, Азии и Южной Америки. В указанный период были зарегистрированы 3248 случаев чумы, из которых 584 привели к летальному исходу (World Health Organization. Facts about plague. 2017).

В связи с изложенным выше, дальнейшее изучение механизмов патогенеза бактерий рода *Yersinia* на клеточном и субклеточном уровнях является актуальным. Это относится, прежде всего, к начальной стадии заболеваний, а именно первичному контакту бактерии с клетками хозяина и значимости в этом взаимодействии поверхностных структур возбудителя (Бывалов и др., 2017).

1.2. Поверхностные антигены иерсиний

Применительно к бактериальным инфекциям остаются малоизученными процессы, происходящие при первичном контакте бактериальных клеток с клетками хозяина (Бывалов и др., 2017). От особенностей протекания такого взаимодействия будут зависеть патогенез и исход заболевания (Бывалов и др., 2017). Процесс адгезии бактериальной клетки к поверхности эукариотической

принято считать двухстадийным (Verne et al., 2018; Бывалов, Конышев, 2019). На первой стадии происходит сближение клеток и обратимое неспецифическое связывание их мембранных поверхностей, определяемое главным образом гидрофобным взаимодействием (Doyle, 2000; Shoaf-Sweeney, Hutkins, 2009; Бывалов, Конышев, 2019). Вторым этапом является необратимое связывание, в котором принимают участие адгезины со стороны бактериальной клетки и специфические или неспецифические рецепторы, расположенные на поверхности эукариотических клеток хозяина. Именно для предотвращения или существенного ослабления первичного взаимодействия микробной клетки и клеток хозяина разрабатываются подходы к профилактике и лечению многих бактериальных инфекций (Shoaf-Sweeney, Hutkins, 2009; Cozens, Read, 2012; Бывалов, Конышев, 2019).

В процессе адгезии принимают участие поверхностные структуры эукариота в виде набора соответствующих рецепторов (Kline et al., 2009; Zav'yalov et al., 2010) наряду с неспециализированными участками клеточной мембраны (Бывалов и др., 2017). У бактерий адгезию с различной степенью специфичности относительно объекта адгезии осуществляют поверхностно расположенные макромолекулярные комплексы различной химической природы и морфологии (Mikula et al., 2013; Бывалов и др., 2017). Они взаимодействуют с соответствующими компонентами клеточной мембраны эукариота либо напрямую, либо опосредованно, через внеклеточный матрикс (Бывалов и др., 2017). На первом этапе адгезия бактерий является неспецифической и обратимой, после чего возможно более выраженное и необратимое прикрепление микроба, обеспечиваемое действием адгезинов или внеклеточных полимеров (Boyle, Finlay, 2003; Бывалов и др., 2017). В настоящее время, с использованием микробиологических, иммунохимических, молекулярно-генетических, биофизических методов исследования, для бактериальных клеток *Yersinia pseudotuberculosis* было установлено наличие порядка 15 поверхностных молекул, которые могут выступать в роли адгезинов. Данные молекулы преимущественно являются белками, однако их структура и химический состав могут сильно

различаться. В частности, к бактериальным адгезинам относятся липополисахариды, а также группа белков, опосредующих взаимодействие патогена и хозяина, например, Ail, YadA, YadB, YadC, Pla, Psa (pH 6), порины OmpF, OmpC, инвазин и другие (Mikula et al., 2013; Бывалов, Коньшев, 2019). Они проявляют свои адгезивные свойства на разных стадиях инфекционного процесса, дополняя друг друга своей способностью связываться с различными молекулами хозяина, такими как коллаген, фибронектин, ламинин, β 1-интегрины регуляторы комплемента и др. (Mikula et al., 2013; Бывалов, Коньшев, 2019). Все белки закреплены во внешней мембране бактерий, часто образуя стержнеподобные или фимбриальные структуры, выступающие во внеклеточную среду.

Бактериальные адгезины подразделяют по их структурно-функциональным особенностям на несколько основных классов: адгезины-аутотранспортёры, фимбриальные адгезины, белки семейства OmpX, омптин-подобные белки и др. (Chauhan et al., 2016; Solanki et al., 2018; Бывалов, Коньшев, 2019). Установлено, что патогенные иерсинии, в частности *Y. pseudotuberculosis*, растущие при разных условиях, могут продуцировать многие адгезины из приведенных выше групп (Chauhan et al., 2016; Leo, Skurnik, 2011; Бывалов, Коньшев, 2019).

Липополисахарид (ЛПС) — компонент клеточной стенки, характерный для грамотрицательных бактерий, являющийся типичным молекулярным паттерном патогена, который позволяет клеткам млекопитающих распознавать бактерии, попавшие в организм, и запускать иммунный ответ (Matsuura, 2013). По данным литературы, содержание ЛПС на поверхности бактериальных клеток может достигать 75 % (Lu et al., 2011). Он позволяет бактериям более эффективно уклоняться от иммунного ответа организма, также ЛПС влияет на бактериальную колонизацию и адгезию (Moran, 2007; Palmer et al., 2007; Camesano et al., 2007). Липополисахариды состоят из трёх основных компонентов: гидрофобный домен, также известный как липид А; коровый олигосахарид (core); дистальный полисахарид (О-антиген, О-боковые цепи) (Raetz, Whitfield, 2002). На рисунке 1 приведено схематичное строение и расположение ЛПС на поверхности грамотрицательных бактерий.

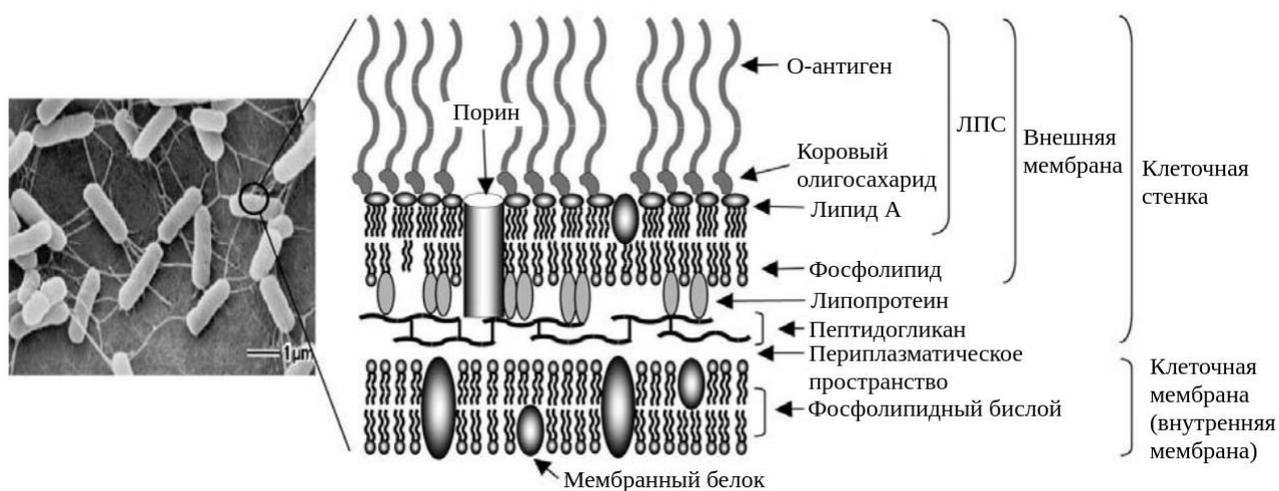


Рисунок 1 – Схематичное изображение структуры клеточной стенки грамотрицательных бактерий (Ogawa et al., 2007)

Липид А (эндотоксин), представляющий собой гидрофобный якорь липополисахарида, является фосфолипидом на основе глюкозамина и формирует внешний монослой наружной мембраны большинства грамотрицательных бактерий (Raetz, Whitfield, 2002). Известно, что липид А липополисахарида участвует в иммунном распознавании бактериальных клеток рецепторами TLR4, CD14 эукариоцитов. Специальный белок-переносчик липидов в плазме доставляет липид А бактерий (или фрагментов бактериальной мембраны) к CD14 на поверхности клеток животных (Ulevitch, Tobias, 1999). Далее происходит распознавание липида А (или, возможно, комплекса липид А/CD14) рецепторным белком TLR4 и запускаются процессы иммунного ответа (Hoshino et al., 1999). Также в процессе взаимодействия липида А с TLR4 могут участвовать и другие белки, например, MD2 (Shimazu et al., 1999).

Коровый олигосахарид может быть разделён на два основных региона: внутренний кор (расположенный ближе к липиду А) и внешний кор. Внешняя область кора обеспечивает присоединение О-антигена.

Наиболее вариабельной частью липополисахарида является О-полисахарид. Он определяет серологическую специфичность О-антигена в организме, однако, количество типов О-полисахарида может сильно варьировать внутри одного вида бактерий. Например, кишечная палочка способна продуцировать приблизительно

170 O-серотипов. Структурное разнообразие O-антигенов поразительно: распознано более 60 моносахаридов и 30 различных неуглеводных компонентов (Knirel, Kochetkov, 1994; Jansson et al., 1999). Структура O-полисахаридных участков может различаться химическим составом и расположением O-гликозидных связей (Raetz, Whitfield, 2002). O-антигенные субъединицы могут включать различное количество моносахаридов, они могут быть линейными или разветвленными и могут образовывать гомополимеры (т.е. в структуре используется один моносахаридный компонент) или, чаще, гетерополимеры. В некоторых случаях нестехиометрические модификации (например, O-ацетилирование или гликозилирование) затрудняют точную идентификацию единицы O-антигена.

OmpC и OmpF - два основных пориновых белка, выполняющих функцию пассивных диффузионных каналов для малых молекул, питательных веществ, антибиотиков и токсичных солей (Hejair et al., 2017). Предполагается, что данные белки могут принимать участие в адгезии патогена к клеткам хозяина. Так, в работах (Rolhion et al., 2005; Rolhion 2007) указывается, что потеря порына OmpC для *E. coli* приводила к снижению адгезии к клеткам кишечника. Для порына OmpF приводятся данные, что он имеет в своей структуре антигенные эпитопы, к которым, при попадании бактерий в организм, происходит синтез специфических антител (Klebba et al., 1990; Fourel et al., 1993). Опубликованы также результаты исследований, указывающие на его возможную роль в патогенезе бактерий, в частности, в процессе адгезии, инвазии и устойчивости к сыворотке (Su et al., 1990; Duperrthuy et al., 2010).

Ail - это кодируемый хромосомой белок размером 17 кДа, который связывают с вирулентностью *Yersinia* (Miller, Falkow, 1988; Miller et al., 1990). Экспрессия Ail бактериями в стационарной фазе происходит исключительно при 37 °C при пониженном парциальном давлении кислорода и зависит от pH, тогда как экспрессия в лог-фазе обнаруживается при более низких температурах (Pierson, Falkow, 1993). Исходя из данных о структуре этого белка, на нём имеются участки, которые вносят вклад в адгезивные свойства патогена (Mikula et al, 2019).

Впервые достаточно подробно были описаны свойства антигена Psa *Y. pestis* в 1961 году Ben-Efraim и соавт. (Ben-Efraim et al., 1961), которые показали, что у бактерий, инкубированных при значении pH менее 6 и температуре 37 °C снижается электрофоретическая подвижность, что связано с экспрессией антигенного компонента. Отмечается, что иммунная система хозяина ослабляет бактерии, не способные к экспрессии этого компонента. Было показано, что мутация в гене, кодирующем Psa антиген, приводит к 200-кратному увеличению полуметальной дозы (ЛД₅₀) мутантов по сравнению с диким типом (Lindler et al., 1990). Таким образом, экспрессия антигена Psa имеет большое значение при реализации патогенетического потенциала бактерий, в частности, в качестве адгезина.

1.3. Методы оценки силы взаимодействия биологических микробиологических объектов

Все биологические процессы, от клеточной подвижности до репликации ДНК, управляются силами, действующими на уровне отдельных молекул. Эти силы приводят в движение биологические объекты (молекулы, органоиды и др.). Существуют также силы, направленные на устранение или уменьшение движения, например, посредством связывания лигандов с соответствующими рецепторами или посредством сворачивания полипептида в стабильную трёхмерную структуру (Neuman, Nagy, 2008). Такие взаимодействия между биологическими макромолекулами обычно изучаются с помощью проведения исследований кинетики связывания, проведения анализа с использованием калориметрических методов, рентгеновской дифракции, ядерного магнитного резонанса и других видов спектроскопического анализа. Эти методы не обеспечивают непосредственного измерения сил межмолекулярного связывания, которые являются фундаментальными для функционирования процессов ассоциации, таких как взаимодействие «лиганд-рецептор» (Dammer et al., 1995).

В настоящее время методы силовой спектроскопии стали одним из основных инструментов при исследовании сил и движений, возникающих при взаимодействии биологических молекул, клеток, а также при проявлении ферментативной активности. Существует множество методов силовой

спектроскопии, таких как манипулирование биообъектами с помощью микроигл (Cluzel et al., 1996), силовое зондирование биомембран (Evans, 1995), индуцированное потоком жидкости растяжение биообъекта (Smith et al., 1992; Kim et al., 2007) и др., однако, наибольшее распространение получили три основных метода: метод оптической ловушки, магнитный пинцет и атомно-силовая микроскопия (Neuman, Nagy, 2008). В таблице 1 приведена сравнительная характеристика основных методов силовой спектроскопии.

Таблица 1 – Сравнение методов силовой спектроскопии единичных молекул (Neuman, Nagy, 2008)

	Оптический пинцет	Магнитный (электромагнитный) пинцет	Атомно-силовая микроскопия
Пространственное разрешение (нм)	0,1-2	5-10 (2-10)	0,5-1
Временное разрешение (с)	10^{-4}	$10^{-1}-10^{-2}$ (10^{-4})	10^{-3}
Жёсткость (пН/нм)	0,005-1	$10^{-3}-10^{-6}$ (10^{-4})	$10-10^5$
Диапазон сил (пН)	0,1-100	$10^{-3}-10^2$ (0,01- 10^4)	$10-10^4$
Диапазон смещения (нм)	$0,1-10^5$	$5-10^4$ ($5-10^5$)	$0,5-10^4$
Размер зонда (мкм)	0,25-5	0,5-5	100-250

1.3.1. Общая характеристика метода оптической ловушки

Оптический пинцет, известный также как метод оптической ловушки, является универсальным методом манипуляции единичными микрообъектами. Он может использоваться для приложения силы до сотен пиконьютон к частицам, имеющим размер от нанометров до нескольких микрометров, позволяя оценивать смещение захваченной частицы в трёхмерном пространстве с субнанометровой точностью и субмиллисекундным временным разрешением (Neuman, Nagy, 2008). Эти свойства делают оптический пинцет подходящим для проведения

экспериментов по силовой спектроскопии и определению характеристик движения биологических объектов.

Для захвата и манипулирования микроскопическими частицами в оптической ловушке используется сфокусированный лазерный луч, в результате действия которого возникают силы, действующие на частицу: сила рассеяния, создаваемая фотонами вдоль направления их распространения, и градиентная сила, создаваемая градиентом интенсивности поля (рисунок 2А) (Zhang, Liu, 2008). В качестве объекта манипуляций в данной системе могут использоваться микросферы из диэлектрического материала, покрытые различными молекулами (Svoboda et al., 1993), органоиды (Khatibzadeh et al., 2014), бактериальные клетки (Darfeuille-Michaud et al., 1990) и др.

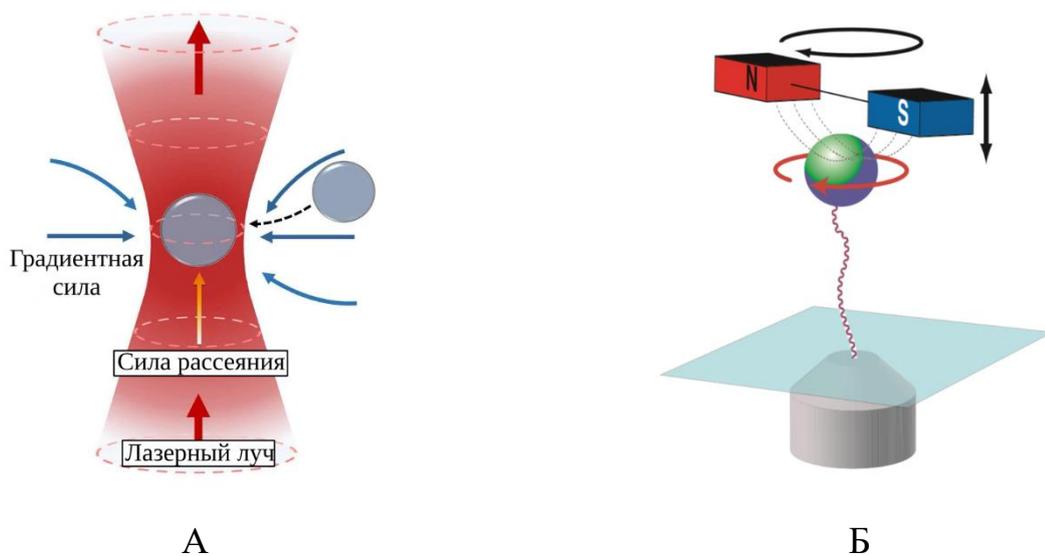


Рисунок 2 – Схематическое изображение принципа действия оптической ловушки (А) (Zaltron et al., 2020) и магнитного пинцета (Б) (Neuman, Nagy, 2008).

1.3.2. Общая характеристика магнитного пинцета

Магнитный пинцет - метод силовой спектроскопии, позволяющий манипулировать магнитными частицами, сенсibilизированными биологическими молекулами, при помощи пары постоянных магнитов. Соответственно, точность, чувствительность метода, а также жёсткость ловушки, будут зависеть от используемых магнитов. Данный метод обладает рядом уникальных

преимуществ в сравнении с остальными методами силовой спектроскопии: простота и надёжность реализации эксперимента, возможность приложения крутящего момента к зонду, естественное функционирование и простая калибровка в режиме постоянной силы (Lipfert et al., 2009), возможность проводить несколько параллельных измерений (Ribeck, Saleh, 2008; Vlaminck et al., 2011), отсутствие нагрева и фотоповреждения образца.

На рисунке 2Б приведена схема устройства магнитного пинцета. Суперпарамагнитная микросфера удерживается парой постоянных магнитов, расположенных над камерой эксперимента. Магниты создают градиент магнитного поля вдоль осевого направления, что приводит к возникновению силы, действующей на микросферу, направленной вверх к магнитам. Сила контролируется путём перемещения магнитов в осевом направлении, вращение магнитов приводит к вращению магнитной микросферы (Neuman, Nagy, 2008).

Применение магнитного пинцета в биологических исследованиях разнообразно. Магнитный пинцет был использован в качестве инструмента для изучения биологических процессов, происходящих с участием нуклеиновых кислот (Koster et al., 2010; Dulin et al., 2013). Также он нашёл применение в исследованиях механических свойств белков (Lee et al., 2000; Shang, Lee, 2007) и клеток (Smith et al., 2008; Tanase et al., 2007).

1.3.3. Общая характеристика атомно-силовой микроскопии

Атомно-силовая микроскопия, благодаря своей способности получать изображения биологических объектов в субнанометровом разрешении, а также определять силы взаимодействия различных биообъектов на мономолекулярном уровне с чувствительностью до нескольких пиконьютонов, является мощным инструментом для проведения исследований в области бионанотехнологий (Senapati, Lindsay, 2016). Данный метод не требует сложной подготовки образцов, например, окрашивания или нанесения металлического покрытия, и позволяет проводить на молекулярном уровне исследования как в воздушной, так и в жидкой

среде для изучения явлений, происходящих при физиологических условиях (Drake et al., 1989; Bustamante et al., 1997; Nguyen-Tri et al., 2020).

С момента разработки метода в 1985 году (Binnig et al., 1986), атомно-силовая микроскопия стала одним из тривиальных методов, использующихся при проведении исследований в таких областях как биология и материаловедение, однако, на начальном этапе создания метода была доступна работа только в воздушной среде или в вакууме. Новые возможности для проведения биофизических исследований появились после модификации метода, позволяющей проводить АСМ в жидкости (Hansma et al., 1994). Эта модификация дала АСМ значительное преимущество перед схожими методиками визуализации, такими как СЭМ (сканирующая электронная микроскопия) и ТЭМ (трансмиссионная электронная микроскопия). Таким образом, образцы могут быть визуализированы практически в их нативном состоянии без использования дополнительных модификаций, таких как окрашивание или использование меток. Визуализация объектов с использованием АСМ может осуществляться в трёх основных режимах: контактном (contact mode), бесконтактном (noncontact mode) и полуконтактном (semi-contact mode).

Контактный режим характеризуется постоянным взаимодействием между иглой зонда и образцом. Конец иглы следует за рельефом поверхности во время процесса сканирования. Основными преимуществами данного режима является скорость сканирования, простота реализации и возможность одновременного измерения другого параметра системы, в частности, механического (трение) или электрического (сопротивление). При работе в контактном режиме можно получить изображения с лучшим разрешением, чем в остальных режимах, но при этом может наблюдаться износ или загрязнение зонда или повреждение поверхности образца во время сканирования, что приводит к появлению артефактов на изображении (Jagtap, Ambre, 2006).

Работа в полуконтактном режиме основана на «простукивании» исследуемой поверхности зондом, колеблющимся на своей резонансной частоте с большой амплитудой колебаний. При каждом цикле «постукивания» происходит касание

иглы кантилевера с поверхностью образца и записывается координата точки касания. Контакт зонда с поверхностью происходит в течение очень короткого промежутка времени, что позволяет минимизировать влияние боковых сил, возникающих при сканировании. Поэтому сканирование мягких или хрупких образцов в указанном режиме не приводит к их деформации или повреждению. Кроме того, игла кантилевера меньше изнашивается в сравнении с контактным режимом. На практике частота колебания зонда фиксированная, поэтому влияние сил притяжения и отталкивания со стороны образца приводит к изменению амплитуды колебаний зонда. Регистрация изменений амплитуды позволяет регулировать положение зонда относительно образца за счёт обратной связи и формировать топографическое изображение поверхности. Основным недостаток полуконтактного режима заключается в том, что прилагаемую к образцу силу, которая, конечно, меньше в сравнении с контактным режимом, трудно контролировать (Nguyen-Tri et al., 2020).

В бесконтактном режиме работы кантилевер колеблется на некотором расстоянии от поверхности образца при своей резонансной частоте, но в отличие от полуконтактного режима, с низким значением амплитуды колебаний. Приближаясь к образцу, силы притяжения и отталкивания начинают влиять на резонансную частоту зонда, что регистрируется прибором. Методом обратной связи зонд перемещается относительно поверхности, чтобы восстановить значение частоты, что позволяет установить координаты поверхности образца и произвести картирование. Таким образом, бесконтактный режим АСМ основан на регистрации сигнала изменения резонансной частоты зонда за счёт действующих на него сил притяжения или отталкивания со стороны поверхности образца. Данный режим является наименее деструктивным, но также имеет и наименьшую разрешающую способность среди представленных вариантов проведения АСМ. Следует отметить, что бесконтактное сканирование образцов подходит в первую очередь для изучения мягких и хрупких образцов, которые могут быть легко повреждены путём деформации (сдвига) в направлении сканирования (Nguyen-Tri et al., 2020).

Другим распространённым методом картирования поверхности образца с использованием АСМ является фазовая визуализация, основанная на регистрации различий в свойствах поверхности (силы адгезии, трения и упругости) неоднородных образцов. Переход зонда между двумя участками образца, имеющими разную плотность, сопровождается фазовым сдвигом между сигналом, который генерирует колебания кантилевера, и выходным сигналом колебаний зонда. Фазовый сдвиг отражает изменения в механических свойствах сканируемой поверхности (Park Systems Phase Imaging/Phase Detection Microscopy. 2020). Поскольку изменение фазы является характеристикой энергопоглощающей способности образца, оно характерно для твёрдых и упругих материалов или, в более общем смысле, для материалов с низкой и высокой энергопоглощающей способностью (Schmitz et al., 1997). Фазовая визуализация позволяет изучать однородность различных материалов или локализацию протекающих в образце процессов, например, проводить фазовую дифференциацию липидов (Lin et al., 2006) или определять проникновение изучаемых лекарственных веществ внутрь наночастиц (Simon et al., 2004).

Помимо визуализации образцов атомно-силовой микроскоп может быть использован в режиме силовой спектроскопии для получения информации о физических характеристиках биологических объектов, которыми могут являться силы взаимодействия в системах “молекула - молекула” (Gunning et al., 2016), “молекула - клетка” (Rajan et al., 2017) и “клетка - клетка” (Hoffmann et al., 2011; Zuttion et al., 2018; Rajan et al., 2017) (примерами отдельных пар, взаимодействующих в таких системах, могут являться пары “лиганд - рецептор” (Rajan et al., 2017, Florin et al., 1994), “антиген - антитело” (Willemsen et al., 1998; Lv et al., 2010) и др.), эластичность и упругость биообъекта (Cohen, Kalfon-Cohen, 2013), динамика процесса сворачивания и разворачивания белков (Carrion-Vazquez et al., 1999; Rief et al., 1997), адгезивные свойства (Puech et al., 2006) и др. Это достигается путем модификации зонда и поверхности подложки соответствующими биомолекулами.

В ходе дальнейшего развития атомно-силовой микроскопии, данный метод позволил определять расположение конкретных взаимодействий в пространстве, путём снятия силовых кривых в каждой точке изображения (Radmacher et al., 1994; Gaboriaud et al., 2008; Medalsy et al., 2011). Таким образом, совмещение визуализации и силовой спектроскопии с использованием АСМ позволило разработать методики картирования специфических межмолекулярных взаимодействий на поверхности биообъекта, в некоторых случаях, на уровне единичных молекул. Однако, метод картирования сил взаимодействия имеет два недостатка: низкое латеральное разрешение и более длительная постановка эксперимента в сравнении с классическим экспериментом по силовой спектроскопии.

Как показано на рисунке 3, атомно-силовой микроскоп состоит из зонда (кантилевера), неподвижно закреплённого в системе, лазера и позиционно чувствительного фотодетектора. В атомно-силовой микроскопии в качестве зонда используется кантилевер, представляющий собой массивное основание, размером несколько миллиметров, с выступающей из его боковой стороны балкой, на конце которой находится острая игла. К поверхности иглы можно присоединить отдельные молекулы, клетки и их фрагменты для изучения межмолекулярных взаимодействий с разрешением до нескольких десятков пиконьютон. Также игла позволяет совершать разного рода манипуляции, например, перемещение, растягивание и распутывание различных полимеров (Brantley et al., 2013). Лазерный луч падает на поверхность консоли и, отражаясь от нее, попадает на фотодетектор. Взаимодействие иглы кантилевера с поверхностью образца приводит к изгибу консоли, что в свою очередь приводит к отклонению отражённого лазерного луча, регистрируемого на фотодетекторе (Белозёров и др., 2019; Белозёров и др., 2021). Благодаря реализации механизма обратной связи в АСМ присутствует возможность поддержания постоянной силы нажима и высоты над поверхностью образца во время его сканирования путём приведения в движение пьезостолика (Jalili, Laxminarayana, 2004).

Атомно-силовые микроскопы обладают рядом полезных особенностей, что делает их использование очень привлекательным, особенно в целях изучения силовых характеристик взаимодействия между биологическими объектами, такими как клетки, органеллы клетки, ДНК, РНК, антитела, актиновые филаменты, кинезин, миозин, молекулы липидов и биополимеры. Одной из таких особенностей является возможность использования кантилеверов, радиус закругления зонда которых достигает нескольких нанометров, что позволяет изучать взаимодействия единичных молекул (Kasas et al., 1998). Дополнительные модификации зонда, например, с использованием полиэтиленгликоля (Lee, 2005), помогают разделить молекулярные взаимодействия во времени, что упрощает обработку данных и позволяет отделить специфические взаимодействия от неспецифических. К полезным характеристикам АСМ также могут быть отнесены минимальное деструктивное воздействие на образец, высокая чувствительность метода, автоматизация процесса проведения эксперимента и др.

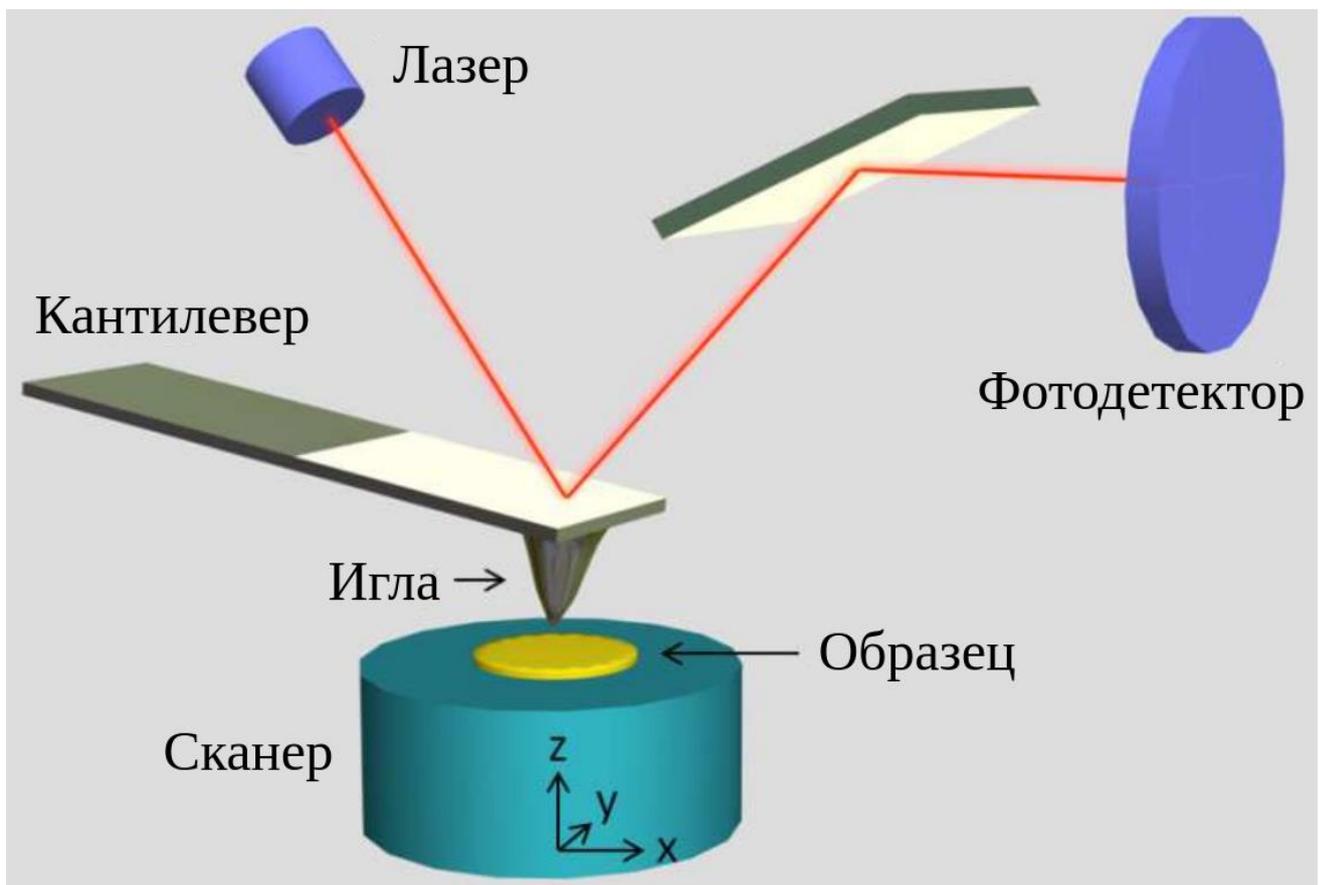


Рисунок 3 – Принципиальная схема устройства атомно-силового микроскопа (Zeng et al., 2012).

Калибровку АСМ-зондов перед проведением силовой спектроскопии осуществляют при помощи нескольких основных методов: теоретический расчёт, метод статического отклика, метод динамического отклика (Aksu, Turner, 2007). Теоретические методы основаны на расчёте жёсткости пружины на основе информации о геометрии зонда. Для такого расчёта используется теория пластин для малых прогибов и предполагается, что кантилевер ведёт себя как линейно упругий и изотропный материал (Sader, 2002). Эти методы используют различные формулы в зависимости от геометрии консоли кантилевера и полагаются на точное знание геометрии и модуля упругости зонда (Neumeister, Ducker, 1994). Однако, из-за особенностей производства зондов трудно проконтролировать равномерность размеров на протяжении всего кантилевера, особенно толщину консоли. Таким образом, размеры, и соответственно жёсткость, могут отличаться даже для зондов, расположенных на одном общем основании.

Методы калибровки по статическому отклику основаны на регистрации сигнала при отклонении кантилевера, путём приложения заранее известной силы. Такая сила может быть приложена с помощью маятника (Butt et al., 1993), дополнительной массы (Senden, Duckert, 1994), либо предварительно откалиброванного (эталонного) кантилевера (Li et al., 1993, Rabinovich, Yoon, 1994). Затем оценивается отклонение кантилевера при известной приложенной силе или массе и производится расчёт жёсткости кантилевера.

При калибровке кантилеверов методом статического отклика с использованием маятника на зонде располагается предварительно откалиброванный маятник с известной массой. Во время процесса раскачивания маятника в горизонтальной плоскости измеряется смещение маятника и АСМ-зонда. Знание массы маятника и значений смещения позволяет произвести расчёт коэффициента жёсткости для кантилевера. Этот метод требует вертикального расположения кантилевера с подвешенным за зонд маятником, что невозможно во многих серийных установках АСМ. Точность калибровки снижается по мере увеличения разницы между константой жёсткости кантилевера и маятника, поэтому необходимо проводить предварительную калибровку кантилевера по

отклонению лазера. Таким образом данный метод калибровки является затратным по времени, а погрешность измерений может достигать 50 % (Sader, 2002).

Другим вариантом проведения калибровки методом статического отклика является добавление массы (Aksu, Turner, 2007). Метод заключается в добавлении объекта известной массы на конец балки кантилевера с последующей регистрацией величины её деформации. Точность результатов калибровки напрямую зависит от точности определения значений массы и координаты расположения объекта на кантилевере. По завершении калибровки объект удаляется с поверхности зонда. Вследствие непосредственного контакта зонда с материальным объектом данный метод является потенциально разрушительным для кантилевера. Несмотря на свои недостатки, метод не требует проведения предварительной оценки жёсткости кантилевера.

Наиболее универсальным и наименее деструктивным методом калибровки по статическому отклику является использование кантилевера сравнения. Метод калибровки с использованием эталонного кантилевера (Aksu, Turner, 2007) требует тонких манипуляций и точного позиционирования двух кантилеверов (калибруемого и эталонного) друг над другом. Для корректного определения перемещения эталонного кантилевера в пространстве необходимо провести предварительную калибровку пьезостолика атомно-силового микроскопа, на котором закреплён эталон. После оценки отклонения эталонного кантилевера калибруемым, производится расчёт жёсткости с использованием теории балок. Как и в случае калибровки с использованием маятника, кантилеверы должны иметь близкие значения жёсткости, что также требует предварительной калибровки. Преимуществом данного метода является возможность калибровать зонды, имеющие различную форму и покрытие.

Методы калибровки по динамическому отклику, такие как метод динамического резонанса с добавлением массы (Cleveland et al., 1993), метод регистрации теплового шума (Hutter, Bechhoefer, 1993), метод определения частот колебаний без нагрузки (Sader et al., 1998), основаны на использовании частот резонанса зонда в сочетании с информацией о его геометрии для определения

константы жёсткости. Однако, эти методы принято считать косвенными. Так как измеряемая в данных методах величина не является характеристикой силы или смещения, необходимо проводить дополнительное преобразования этой величины в значение коэффициента жёсткости консоли. Данные методы имеют ряд серьёзных ограничений, например, для получения корректных результатов калибровки методом динамического резонанса с добавлением массы необходимо повторить калибровку несколько раз с различной добавляемой массой, что делает процесс измерения потенциально разрушительным и трудновыполнимым. Калибровка кантилевера путём регистрации теплового шума ограничена точностью регистрации колебаний консоли зонда, а максимальная определяемая жёсткость не может превышать 1 Н/м. Этот метод может быть применён к кантилеверам, имеющим различную форму и покрытие, однако для такой калибровки требуется точное знание о материале зонда, его геометрии и т.д. Метод определения частоты колебаний без нагрузки основан на измерении резонансной частоты кантилевера в вакууме. Применение данного метода является сложным для калибровки зондов, имеющих покрытие или состоящих из нескольких слоёв, однако это компенсируется отсутствием необходимости добавления массы и применимостью к кантилеверам любой формы.

Также существуют методы калибровки с использованием специальных инструментов (Holbery et al., 2000; Behrens et al., 2003; Cumpson et al., 2004). Использование таких методов требует наличия специального оборудования и значительной подготовки.

Каждый из представленных выше методов калибровки имеет свои достоинства и недостатки, связанные с практичностью, областью применения и стабильностью процесса. Выбор метода калибровки зависит от цели исследования и типа кантилевера, в соответствии с которыми будут определяться необходимая точность измерений, простота и длительность проведения калибровки.

1.3.3.1. Методы функционализации минеральных поверхностей биообъектами

Проведение силовой спектроскопии с использованием атомно-силовой микроскопии, а также обработка и интерпретация полученных результатов в значительной степени зависит от выбранного метода функционализации взаимодействующих поверхностей кантилевера и подложки. В настоящее время используются несколько основных подходов к функционализации: пассивная сорбция, ковалентное связывание биологических молекул с субстратом и использование промежуточных связывающих молекул - линкеров.

Наиболее простым в реализации методом функционализации поверхностей является метод пассивной физической сорбции целевых молекул на носителе. Применение указанного метода для адгезии молекул липополисахарида и поринов на полистироловых микросферах для проведения силовой спектроскопии с использованием метода оптической ловушки описано в работах (Vyvalov et al., 2018; Vyvalov et al., 2018). Другой метод пассивной сорбции основан на полимеризации молекулы на поверхности субстрата. Так, в работе (Huang et al., 2021) приводится описание процесса получения покрытий из полидопамина на поверхности слюды путём погружения слюдяных пластинок в водный щелочной раствор допамина.

Химическая иммобилизация поверхности обычно предусматривает её предварительную модификацию для получения слоя активных групп, например, аминных или карбоксильных, по которым в дальнейшем будет происходить присоединение белковых молекул. В работе (Wang et al., 2011) для оценки сил взаимодействия между бычьим сывороточным альбумином (БСА) и кроличьими антителами к БСА использовали метод иммобилизации белков с применением 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) и N-гидроксисульфосукцинимидом (NHS). Слюда покрывалась слоем золота, с последующим нанесением монослоя тиола, несущего в своём составе карбоксильные хвостовые группы, которые могут быть активированы EDC и NHS. В основе данного метода иммобилизации лежит образование ковалентных связей

между аминогруппами белковой молекулы и карбоксильными группами на субстрате. Другим методом функционализации субстрата является использование аминирования поверхности. Аминирование поверхности слюды может быть проведено с использованием различных методов аминосиланизации. Наиболее распространёнными являются использование гидрохлорида этаноламина в диметилсульфоксиде (Riener et al., 2003), аминофенилтриметоксисилана в толуоле (Ebner et al., 2007), (3-аминопропил)триэтоксисилана (APTES) в толуоле (Riener et al., 2003) или APTES/триэтиламина в газовой фазе (Wang et al., 2002) и других методов. Дальнейшая модификация аминированной поверхности зависит от цели и метода исследования. Например, применение глутарового альдегида для фиксации на поверхности аминированной слюды хроматина приведено в работе (Wang et al., 2002).

Применение линкеров, таких как полиэтиленгликоль (ПЭГ), позволяет упростить обработку сигнала, получаемого при проведении силовой спектроскопии, путём разделения в пространстве и времени специфических и неспецифических разрывов межмолекулярной связи. Одной из особенностей данной методики является возможность обособления специфического взаимодействия “молекула-молекула” от неспецифических взаимодействий с подложной, например, гидрофобных, электростатических, Ван-дер-Ваальсовых и других. Метод иммобилизации биологических молекул на зонде через линкер позволяет получать “специфические биосенсоры” (Wildling et al., 2011; Koehler et al., 2019; Li et al., 2017), несущие на своей поверхности единичные молекулы. Биофункционализированный зонд может использоваться не только для изучения биофизических параметров взаимодействия с целевыми молекулами, но и для картирования соответствующих целевых молекул на поверхности образца. Таким образом, метод позволяет изучать единичные взаимодействия между отдельными парами молекул, например, “лиганд-рецептор”, ”антиген-антитело” и другими.

1.3.3.2. Критерии оценки силовых характеристик

Для более точной и комплексной оценки силовых характеристик межмолекулярного взаимодействия в силовой спектроскопии используются несколько основных дополняющих друг друга критериев: амплитуда разрыва первой связи, амплитуда разрыва последней связи, работа сил адгезии, максимальная адгезия, длина полимера, средняя сила всех отрывов, количество отрывов на одну силовую кривую и др. Данная информация о взаимодействии содержится в хронограммах сигнала “сила - расстояние”, которые записываются во время разведения кантилевера и образца в противоположные стороны.

При проведении исследований по силовой спектроскопии, где используются линкеры или объектом исследования являются протяжённые полимерные молекулы (Willemsen et al., 1998; Krasnoslobodtsev et al., 2007), разрыв первой связи рассматривается как чисто неспецифическое взаимодействие между минеральными поверхностями подложки и зонда. Однако, в случае работы с непротяжёнными молекулами первый отрыв может являться единственным. В таком случае специфичность такого взаимодействия могут определять путём сравнения исследуемого взаимодействия со взаимодействием чистых поверхностей, либо путём блокировки специфической связи конкурирующей молекулой (Lv et al., 2010).

Вторым критерием, который в работах по силовой спектроскопии отмечается как специфический или содержащий специфическую компоненту, является амплитуда разрыва последней связи (Willemsen et al., 1998; Krasnoslobodtsev et al., 2007; Roes et al., 2006; Targosz et al., 2006; Kumar, Hoh, 2001). Последний отрыв происходит на определённом расстоянии от момента контакта, что снижает влияние неспецифических сил (например, гидрофобных, электростатических и др.) со стороны минеральных поверхностей на оценку силы взаимодействия. Считается также, что при параллельном взаимодействии множества молекул, последний разрыв связи может отражать взаимодействие последней пары молекул (Kumar, Hoh, 2001).

Работа сил адгезии является одним из основных критериев, отражающих интегральную характеристику взаимодействия, и определяется как площадь между силовыми кривыми подведения и отведения кантилевера от образца (El-Kirat-Chatel, Dufrene, 2016; Dague et al., 2010). Хотя работа сил адгезии не содержит прямой информации о величине силы разрыва отдельной связи или расстоянии, на котором действует адгезия, она характеризует сумму всех задействованных в процессе связывания сил, образовавшихся во взаимодействующей системе (Jiang, Turner, 2016). Данный критерий очень важен при оценке сил, возникающих при взаимодействии сложных систем, таких как протяжённые полимерные молекулы или клетки.

Максимальная сила адгезии, обычно возникающая на коротких расстояниях, представляет собой силу, которую нужно приложить, чтобы начался процесс разделения взаимодействующих биообъектов, и может отражать разрыв как специфических, так и неспецифических связей (Hoffmann et al., 2011; Zuttion et al., 2018; Rajan et al., 2017; El-Kirat-Chatel, Dufrene, 2016). Она определяется как амплитуда самой нижней точки на силовой кривой отведения.

Длина полимера (при растяжении одной протяжённой полимерной молекулы) или длина разрыва связи (для пары взаимодействующих молекул) определяется как расстояние от кончика иглы кантилевера до поверхности подложки в момент разрыва последней связи (Willemsen et al., 1998; Carrion-Vazquez et al., 1999). Данный критерий позволяет оценить, на какую величину растянулся взаимодействующий комплекс, состоящий из молекул и линкеров на обеих минеральных поверхностях, чтобы в дальнейшем определить специфичность такой связи. Например, в работе (Idiris et al., 2005) описывается применение линкеров различной длины при сенсбилизации поверхностей для разделения взаимодействующих молекул в пространстве. Если длина ассоциата не превышала длину линкера, то такое взаимодействие считалось неспецифическим и наоборот.

Такие критерии, как среднее количество отрывов на одну силовую кривую и вероятность образования межмолекулярной связи могут применяться для оценки количества доступных для взаимодействия молекул на поверхности образца.

Согласно работам (Zuttion et al., 2018; Dammer et al., 1995), добавление к взаимодействующим молекулам, например, блокирующих агентов или ионов металлов, влияющих на способность молекул к связыванию, приводит к изменению значений указанных критериев. Данные критерии также могут указывать на наличие специфической составляющей во взаимодействующей паре при сравнении с заранее известным неспецифическим контролем.

1.3.3.3. Факторы, влияющие на определяемую силу взаимодействия

Оцениваемая сила взаимодействия зависит не только от выбранной модельной системы, на которой производятся измерения, но и от условий проведения эксперимента и свойств среды. Известно, что сила имеет линейную зависимость от логарифма скорости нагружения межмолекулярной связи (Merkel et al., 1999), которая характеризуется скоростью разведения взаимодействующих молекул в разные стороны и жёсткостью зонда (Riener et al., 2003). Измеряя силу при различных скоростях нагружения, можно получить информацию о динамике процесса диссоциации взаимодействующих молекул (Li et al., 2013), а также получить данные о силах разрыва связи в равновесном состоянии и энергетическом ландшафте образующихся молекулярных комплексов (Zhang et al., 2002).

Время контакта (время нахождения зонда в непосредственном контакте с подложкой) является ещё одним условием, влияющим на силовые характеристики взаимодействия. Так, Li и соавт. (Li et al., 2013) отмечают, что вероятность образования связи с поверхностью увеличивается экспоненциально с увеличением времени взаимодействия. Предположительно, контактирующим молекулам необходимо время, чтобы подойти к друг к другу в пространстве и установить прочную связь. Молекулам разных видов нужно разное время для установления связи, однако после определённого временного промежутка наблюдается насыщение связей, что выражается в отсутствии изменения силовых характеристик при последующем увеличении времени контакта (Бывалов, Коньшев, 2019; Li et al., 2013; Wickham et al., 1990).

Повышение концентрации взаимодействующих молекул на контактирующих поверхностях зонда и подложки приводит к образованию множества параллельных специфических и неспецифических связей между молекулами. Это означает, что при низкой разрешающей способности прибора и низкой частоте записи силовых кривых одно событие по разрыву связей на силовой кривой может соответствовать разрыву множества связей, образовавшихся в системе. Влияние концентрации антител на оцениваемую силу было продемонстрировано для сложной системы “клетка - биспецифичные антитела - клетка” (Hoffmann et al., 2011). Увеличение концентрации антител приводило к увеличению максимальной силы связывания. Пример применения сенсбилизации поверхностей препаратами с низкой концентрацией приведён в работе (Pleshakova et al., 2018). Было показано, что крайне низкая концентрация молекул хотя и позволяет оценивать единичные взаимодействия “молекула - молекула”, приводит к сложностям при определении специфичности связей.

Свойства среды, в которой происходят измерения, также оказывают большое влияние на получаемые результаты. Так, увеличение температуры приводит к снижению регистрируемой силы, что предположительно связано с уменьшением потенциальных энергетических барьеров, возникающих при разрыве межмолекулярной связи (Janovjak et al., 2003). Также отмечается, что изменение температуры оказывает несущественное влияние на механизм разрыва связей. Это означает, что каждый отдельный разрыв связей наблюдается при каждой из используемых в исследовании температур.

К прочим дополнительным условиям, определяющим характер исследуемого взаимодействия, можно отнести свойства клеток (вязкоупругие свойства, натяжение клеточной коры, особенности геометрии клетки), свойства рецепторов (прочность связывания, размещение молекул) (Helenius et al., 2008), наличие ионов металлов в растворе (Li et al., 2013) и др.

1.3.3.4. Силовая спектроскопия единичных молекул

Атомно-силовая микроскопия позволяет изучать взаимодействия отдельных биологических молекул в различных модельных системах, таких как «антиген - антитело», «лиганд - рецептор», «белок - ДНК» и др. В основе таких экспериментов лежит необходимость сенсibilизации поверхностей зонда и подложки различными молекулами, в том числе с помощью химической ковалентной сшивки.

В работе (Willemsen et al., 1998) приводится описание проведения силовой спектроскопии для оценки силы взаимодействия в системе «антиген - антитело». На поверхность подложки наносились молекулы межклеточной адгезии-1 (ICAM-1), а на иглу зонда, состоящую из нитрида кремния, ковалентно присоединяли специфические антитела (анти-ICAM-1) с помощью линкера - модифицированного полиэтиленгликоля, имеющего длину 8 нм. Такая постановка эксперимента позволила вычленивать единичные события специфического распознавания антиген - антитело и оценить силу такого взаимодействия. Подобный эксперимент по силовой спектроскопии описан в работе Avci и соавт. (Avci et al., 2004), где на подложку наносили молекулы коллагена, который выполнял роль антигена, а к поверхности зонда с использованием химической ковалентной сшивки через полиэтиленгликоль присоединяли поликлональные антитела, комплементарные коллагену. Задача данного исследования заключалась в определении возможности использования АСМ для локализации специфических взаимодействий на гетерогенных, имеющих сложную поверхность, образцах, которые в большей степени отражают реальные биологические системы.

Другой вариант изучения взаимодействия между антигеном и антителами приводится в работе (Lv et al., 2010). На поверхность подложки и зонда методом самособирающегося монослоя сорбировались мышинные антитела, специфические к человеческому иммуноглобулину, и антиген, в качестве которого использовался человеческий иммуноглобулин G (IgG), соответственно. Использование таких простых неполимерных модельных объектов как антитела, приводит к упрощению взаимодействующей системы, что позволяет выделить специфические взаимодействия на уровне отдельных молекул. Использование простой системы

взаимодействующих объектов, а также применение линкеров при функционализации соответствующих поверхностей позволяет не только определять силу взаимодействия молекул, но и минимизировать неспецифическое влияние минеральных поверхностей подложки и кантилевера на оцениваемое взаимодействие. Так, Idiris и соавт. (Idiris et al., 2005) указывают на то, что плотное соприкосновение сенсibilизированных поверхностей может приводить к денатурации сенситинов за счёт их конформационной деформации, повышению неспецифического связывания и уменьшению подвижности белковых молекул, что негативно сказывается на успешном специфическом связывании.

Также проводились исследования взаимодействий с использованием других биологических модельных систем, таких как “лиганд - рецептор”. Общая схема проведения эксперимента схожа с моделью “антиген - антитело”: на игле зонда размещается лиганд или рецептор путём физической или химической сорбции, в то время как на подложку наносится комплементарная ему молекула. Примерами таких систем могут быть пары “стрептавидин - биотин” (Lee et al., 1994), “авидин - биотин” (Florin et al., 1994) и другие. Однако, наиболее часто модельная система “лиганд - рецептор” применяется в опытах по силовой спектроскопии клеток.

Широкое распространение атомно-силовая микроскопия также получила при изучении процессов, происходящих с участием нуклеиновых кислот. Так, Lee и соавт. (Lee et al., 1994) изучали процесс взаимодействия единичных цепей ДНК между собой, а также определяли силу этого взаимодействия. В другом исследовании (Krasnoslobodtsev et al., 2017) проводилась работа по оценке силы взаимодействия между ферментом рестрикции и молекулой ДНК.

С использованием силовой спектроскопии могут быть определены реологические свойства отдельных молекул. Например, в работе (Zhang et al., 2002) молекулы поли(N-изопропилакриламида) наносили на стеклянные пластинки путём пассивной сорбции из водного раствора. При помощи пьезостолика образец подводили к зонду, во время контакта молекулы адсорбировались на зонде за счёт неспецифических связей между полимером и иглой, образуя между ними соединительный мостик. Во время отведения кантилевера от образца полимерная

цепь растягивалась, увлекая за собой консоль кантилевера, отклоняя её. В результате были получены графики зависимости «сила - растяжение полимера», на основе которых определялись эластические свойства молекулы.

1.3.3.5. Силовая спектроскопия клеток

Понимание процессов, лежащих в основе межмолекулярных взаимодействий, позволяет, во-первых, установить роль тех или иных молекул в адгезивности, например, бактериальных клеток к эукариотам, и, во-вторых, изучить возможность влияния на силу взаимодействия, что может быть востребовано при разработке иммунобиологических препаратов. При изучении взаимодействий биологически активных молекул наибольший интерес представляет оценка силовых характеристик взаимодействия на клеточном уровне в физиологических условиях. Так как клетки являются крайне сложными комплексными системами, изучение их свойств затруднено множеством процессов, протекающих внутри и на поверхности клеток. С целью исключения влияния побочных клеточных процессов на оценку силовых характеристик могут быть использованы более простые модельные системы, такие как молекула-клетка или молекула-молекула.

Первым этапом оценки силовых характеристик взаимодействия клетки с антигенами является изучение её морфологических особенностей и выбор участка поверхности, на котором будет производиться оценка силы взаимодействия молекул, в частности, в системе лиганд-рецептор. На начальном этапе разработки метода АСМ было доступно изучение клеток только в фиксированном (неживом) состоянии (Radmacher et al., 1992). В дальнейшем были разработаны методики работы с живыми клетками, что позволило изучать новые особенности клеточной поверхности (Barbee et al., 1995; Garcia et al., 1993; Holstein et al., 1994; Lal et al., 1995; Schoenenberger, Hoh, 1994; Tao et al., 1992). Также некоторые новые варианты АСМ применялись для изучения внутренних структур клеток (Schoenenberger, Hoh, 1994; Henderson et al., 1992; Keller et al., 1992). Исследование живых клеток с помощью атомно-силовой микроскопии является сложной задачей, что связано с

ограничением разрешающей способности вследствие мягкости и сложности рельефа клеточной поверхности. Кроме того, живые клетки трудно зафиксировать на плоской поверхности подложки. Одним из способов решения данной проблемы является использование микропипетки или фильтров, с последующей визуализацией выступающей поверхности клетки (Schoenenberger, Hoh, 1994; Horber et al., 1995; Kasas, Ikaï, 1995). Полученные изображения клеточной поверхности используются на этапе силовой спектроскопии для составления координатной сетки, в соответствии с которой определяются координаты точки взаимодействия.

После получения сканов поверхности переходят ко второму этапу - проведению силовой спектроскопии. В работе (Targosz et al., 2006) приводится оценка силовых характеристик взаимодействия бактериальных антигенов с рецепторами на поверхности макрофагов с использованием атомно-силовой микроскопии. Авторы использовали антигены трёх типов: липополисахариды (ЛПС), пептидогликан и экзополисахариды (ЭПС). Макрофаги имеют на своей поверхности рецепторы, такие как TLR4, TLR2 и др., способные специфически распознавать бактериальные антигены. В работе использовались макрофаги двух типов: 1) клетки, выделенные из СВА мышей, несущие на своей поверхности специфические к указанным антигенам рецепторы; 2) клетки, выделенные из генетически модифицированных мышей линии С3Н/Ж с инактивированным рецептором TLR4. Антигены иммобилизовали на поверхности АСМ-зонда с использованием химической сшивки через (3-Aminopropyl)triethoxysilane (APTES), клетки инкубировали на поверхности покровных стёкол. В ходе эксперимента было показано, что рецепторы образуют два комплекса с ЛПС: TLR2-ЛПС и TLR4-ЛПС. В ходе исследования было установлено, что для модифицированных макрофагов, у которых инактивирован рецептор TLR4, отсутствует специфическое взаимодействие между ЛПС и клеточной поверхностью через данный рецептор.

Результаты изучения динамики взаимодействия между аптомером GBI-10 и тенасцином-С (TN-C) на поверхности клеток глиобластомы человека были опубликованы в работе (Li et al., 2013). На поверхности кантилевера размещался

аптомер GBI-10 с использованием APTES и гетеробифункционального полиэтиленгликоля (Ebner et al., 2007). В процессе оценки силовых характеристик использовались живые клетки линии U251 в фосфатном буферном растворе. Клетки U251 несут на своей поверхности белок TN-C, специфический к GBI-10. Все измерения проводились в двух модификациях: а) живые клетки U251 — кантилевер, функционализированный GBI-10, и б) живые клетки U251, обработанные аптомером GBI-10 для блокировки рецепторов, — кантилевер, функционализированный GBI-10. Добавление GBI-10 к клеткам приводило к исчезновению разрывов связей, регистрируемых на силовых кривых.

Помимо работы с живыми клетками проводились исследования по оценке силовых характеристик взаимодействия антигенов с поверхностью химически иммобилизованных клеток. Такого рода иммобилизация обладает рядом преимуществ. Например, использование глутарового альдегида для инактивации позволяет не только прочно закрепить клетки на поверхности стекла или слюды для последующего проведения силовой спектроскопии, но и, предположительно, обеспечить процесс стабилизации рецепторов в клеточной мембране (Targosz et al., 2006). В работе (Targosz et al., 2006) была проведена оценка силовых характеристик взаимодействия между бактериальными антигенами и поверхностью иммобилизованных макрофагов до и после активации клеток данными антигенами. В эксперименте были использованы антигены двух видов: экзополисахарид, выделенный из *L. rhamnosus*, и липополисахарид *E. coli*. Бактериальными антигенами покрывали поверхность кантилевера с использованием APTES. Эукариотические клетки после обработки бактериальными антигенами и культивирования фиксировались на поверхности стекла при помощи 1.5 % глутарового альдегида в течение 1 минуты. Было показано, что предварительная инкубация макрофагов с ЛПС приводит к снижению эффективности связывания клеточной поверхности с экзополисахаридом (ЭПС), что может быть связано с конкуренцией данных антигенов за одни и те же рецепторы. Активация клеток с использованием ЭПС также приводит к снижению вероятности связывания, однако с одновременным увеличением силы связывания липополисахарида с клетками.

Для интерпретации результатов силовой спектроскопии при взаимодействии антигенов с клетками, в частности для описания специфичности и неспецифичности взаимодействия, применяют различные модели. Например, Wickham и соавт. в своей работе (Wickham et al., 1990) приводят обсуждение моделей взаимодействия вирусных частиц и клеток. Авторы выделяют три модели взаимодействия: 1) моновалентное взаимодействие «вирус-рецептор»; 2) мультивалентное связывание с несколькими рецепторами без полного пространственного насыщения рецепторов; 3) мультивалентное связывание вируса с рецепторами с возможностью насыщения сайтов связывания. Также отмечается, что при мультивалентном связывании специфические моновалентные взаимодействия могут сопровождаться образованием множества неспецифических связей.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Оборудование

Атомно-силовой микроскоп «Ntegra Prima» (NT-MDT, Россия); измерительная ячейка AU-208; АСМ-зонды серии PNP-DB (NanoWorld, Швейцария); АСМ-зонды серии NSG10 (NanoWorld, Швейцария); термостат (Jouan, США); рН-метр «рН-410» (Аквилон, Россия); насадки для фильтрации с диаметром пор 0,22 мкм (Merck, Германия); спектрофотометр (Pharmacia Biotech, Англия); CO₂-инкубатор MCO-20 AIC (Sanyo, Япония); центрифуга Universal 320 (Hettich, Германия); термостат жидкостной MultiTemp III (Amersham Biosciences, Швеция); комплект оборудования для твердофазного иммуноферментного анализа (BioRad, США); микроскопы Бимам-13; микроскоп инвертированный Микромед И (Микромед, Россия); автоклав Tuttnauer 3870 M (Tuttnauer Europe BV, Нидерланды); термошейкер PST-60HZ-4 (Biosan, Латвия); весы аналитические Vibra AF-R220CE (Shinko, Япония); холодильник низкотемпературный MDF-U2086S (Sanyo, Япония); система водоподготовки Elix 3 (Millipore, Германия); ламинарные шкафы I и II класса защиты; сканирующий электронный микроскоп JEOL JSM-6510 LV (JEOL, Япония), автоматическое устройство для нанесения тонкослойных покрытий JEOL JFC-1600 (JEOL, Япония).

2.2. Используемые сенситины

Для функционализации минеральной поверхности кантилевера использовались следующие препараты: козьи антимышинные антитела, меченные FITC, ЛПС-EV, ЛПС-10, порин OmpF, порин OmpC, Ail, Psa.

Для определения условий проведения силовой спектроскопии на базе АСМ кантилевер покрывался препаратом козжих антимышинных антител, меченных FITC (Merck, Германия), который в тексте обозначен как антимышинные антитела.

Препараты ЛПС были получены методом водно-фенольной экстракции по Вестфалю (Westphal, Jann, 1965) сотрудниками лаборатории физиологии микроорганизмов Института физиологии Коми НЦ УрО РАН. Препарат ЛПС-EV был выделен из культуры клеток вакцинного штамма EV *Yersinia pestis*. Характерной чертой данного препарата является отсутствие O-боковых цепей. Препарат ЛПС-10 был получен из культуры клеток *Yersinia pseudotuberculosis 1b*, выращенной при температуре 10 °С; этот препарат ЛПС характеризуется наличием O-боковых цепей.

Порины OmpF и OmpC были выделены сотрудниками лаборатории молекулярных основ антибактериального иммунитета Тихоокеанского института биорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН по методике, описанной в статье (Новикова и др., 1993), из биомассы *Y. pseudotuberculosis*, выращенной при 6-8 и 37 °С, соответственно.

Рекомбинантный белок Ail получали из культуры протеазодефицитного штамма *E. coli* BL21(DE3) («Novagen», США) и проводили его очистку методом металло-хелатной хроматографии (Коньшев и др., 2022). Антиген Psa выделяли из супернатанта культуры *E. coli* DH5 α /pIG824 путём осаждения 30 % раствором сульфата аммония (Бахтеева и др., 2007). Оба препарата были получены из лаборатории микробиологии чумы ФБУН Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии.

Поверхность слюды была покрыта моноклональными антителами двух типов: МКАт2, являющимися комплементарными эпитопу на O-боковых цепях ЛПС *Y. pseudotuberculosis* (Byvalov et al., 2014), и МКАт7, комплементарными белковому эпитопу внешней мембраны иерсиний (Byvalov et al., 2015). Препараты антител были получены сотрудниками лаборатории физиологии микроорганизмов Института физиологии Коми НЦ УрО РАН и иммунохимически охарактеризованы доцентом кафедры биотехнологии ВятГУ Дудиной Любовью Геннадьевной.

2.3. Модификация поверхностей слюды и кантилевера

Процесс функционализации может быть условно разделён на два основных этапа: модификация минеральной поверхности аминными группами и непосредственно функционализация биологическими молекулами.

Первым этапом функционализации кантилевера и подложки являлось аминирование их поверхности с использованием APTES. В экспериментах по силовой спектроскопии использовались кантилеверы серии PNP-DB (NanoWorld, Швейцария). Зонды данной серии затачивают методом термоокисления, за счёт чего на его поверхности образуется тонкий слой оксида кремния (He et al., 2017). В качестве подложки использовались пластинки слюды. Слюда имеет слоистую структуру и относится к группе природных алюмосиликатов. При её скалывании образуется ровная поверхность, содержащая силанольные группы (Si-OH). Наличие силанольных групп на поверхностях слюды и кантилевера позволяет произвести их модификацию с использованием органических силанов (Kim et al., 2002).

Перед проведением процесса аминирования зонды подвергались облучению ультрафиолетом в течение 15 минут для удаления загрязнений. Слуду скалывали непосредственно перед аминированием. Модификацию аминными группами проводили в эксикаторе в среде аргона, к зонду и слюде помещали две ёмкости, содержащие 30 мкл APTES (Sigma-Aldrich, США) и 10 мкл триэтиламина (Reachem, Россия) и выдерживали в течение 1,5 ч. Завершающим этапом модификации являлось удаление не связавшихся с минеральными поверхностями молекул APTES путём термической обработки кантилевера и слюды в сухожаровом шкафу при температуре 60 °C в течение 1 ч.

2.4. Функционализация кантилевера

Для функционализации кантилевера был выбран метод ковалентной сшивки сенситина с аминными группами на поверхности зонда с использованием бифункционального полиэтиленгликоля (Acetal-PEG-NHS) (Ebner et al., 2019). Аминированный зонд помещали в 0,5 мл раствора хлороформа, содержащего 1 мг

ПЭГ и 30 мкл триэтиламина (Reachem, Россия) и инкубировали в течение 2 часов. Далее зонд трёхкратно промывался хлороформом по 5 минут. Для перевода ацетальной группы ПЭГ в альдегидную зонд помещался в 1%-ный водный раствор лимонной кислоты на 10 минут с последующей трёхкратной промывкой в деионизированной воде по 5 минут. Активированный зонд помещали на 1 час в 100 мкл раствора сенситина (50-150 мкг/мл) с добавлением 20 мМ NaCNBH₃ (Sigma-Aldrich, США). Блокировку оставшихся свободных альдегидных групп полиэтиленгликоля проводили путём добавления в реакционную смесь 5 мкл 1М моноэтаноламина (Reachem, Россия) с последующей инкубацией в течение 10 минут. На завершающем этапе функционализации зонд отмывался деионизированной водой 3 раза по 5 минут. Лишняя влага убиралась фильтровальной бумагой. Кантилевер хранился в среде аргона в сухом виде до проведения силовой спектроскопии.

2.5. Функционализация слюды

Ковалентная сшивка моноклональных антител с поверхностью аминированной слюды осуществлялась с использованием трёх основных методик: 1) с использованием NHS (N-гидроксисукцинимид) и EDC (1-Этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид), 2) иммобилизация с использованием полиэтиленгликоля (Acetal-PEG-NHS) и 3) функционализация с использованием глутарового альдегида (ГА).

В соответствии с первой методикой, указанной выше, проводилась активация карбоксильных групп в молекулах МКАт с помощью препаратов NHS и EDC и последующая их сшивка с NH₂-группами на модифицированной слюде. Препараты антител предварительно центрифугировали при 8000g в течение 20 минут. Модифицированная слюда помещалась в 12-лучноный планшет (Jet Biofil, Китай), куда затем добавлялось профильтрованная через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм (Merck, Германия) смесь 900 мкл ФБР, 100 мкл препарата антител с конечной концентрацией 50-150 мкг/мл, 30 мкл 40мМ NHS (Sigma-Aldrich, США) и 0,6 мкл EDC (Sigma-Aldrich, США) (Белозёров и др., 2019). Планшет хранился при

температуре $+(4 - 6) ^\circ\text{C}$ в течение 18 ч. На следующий день содержимое ячеек планшета убирали и пластинки промывали 3 раза по 5 минут в ФБР.

Функционализацию слюды с использованием ПЭГ проводили в соответствии с методикой функционализации кантилевера, изложенной в п. 2.4 “Функционализация кантилевера”. Для оценки влияния плотности покрытия слюды антителами на определяемую силу взаимодействия были использованы антитела МКАт7 в двух концентрациях: 15 и 150 мкг/мл.

Для функционализации слюды с использованием глутарового альдегида аминированные слюдяные пластинки погружались на 30 минут в 8 % раствор ГА. После инкубации пластинки трёхкратно отмывали в 3 мл ФБР по 5 минут и переносили в раствор антител с концентрацией 50-100 мкг/мл в ФБР и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. По окончании процесса инкубации слюду тщательно отмывали ФБР.

2.6. Работа с клеточными культурами

Макрофаги линии J774 и клетки линии KB получены из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН) выращивались в культуральных флаконах 25 см² (Jet Biofil, Китай) с жидкой питательной средой DMEM (БиолоТ, Россия) в CO₂-инкубаторе при концентрации углекислого газа 5 % и температуре 37 °C. Для работы с клетками J774 на атомно-силовом микроскопе клетки культивировались в полистироловых чашках на нарезанных покровных стёклах размером 18x6 мм в объёме 2 мл среды при описанных выше условиях в течение 18 ч. Снятие и пересев клеток с культуральных флаконов на стёкла для АСМ осуществляли с использованием смеси растворов Версена («Панэко», Россия) и трипсина («Панэко», Россия). На следующие сутки клетки промывались фосфатным буферным раствором 3 раза по 1 мл, затем в чашки добавлялся раствор глутарового альдегида в ФБР для иммобилизации клеток. После фиксации клеток проводили отмывку стёкол ФБР.

2.7. Блокировка клеточных рецепторов TLR4 и CD14

Клетки линии J774 после суточной инкубации трёхкратно отмывались питательной средой DMEM, чтобы избавиться от клеточного дебриса, с последующей инкубацией в этой же среде, содержащей блокирующий агент: мышинные моноклональные антитела к рецепторам TLR4 или CD14 (Novus Biologicals, США), или их смесь (концентрация антител каждого типа - 1 мкг/мл), или липополисахарид *Yersinia pestis* вакцинного штамма EV (концентрация ЛПС-EV 100 мкг/мл). Чашки с клетками, обработанными антителами или ЛПС, а также интактными клетками (контроль) инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 30 минут при температуре 37 °С в 5 %-ном CO₂. После инкубации производилась трёхкратная отмывка клеток фосфатным буферным раствором от несвязавшихся антител и ЛПС. Заключительным этапом обработки клеток являлась их фиксация 0,1 %-ным раствором глутарового альдегида в течение 30 минут и последующая трёхкратная кратная отмывка ФБР.

2.8. Сканирование поверхностей

Сканирование поверхности функционализированной слюды проводили на воздухе методом атомно-силовой микроскопии (атомно-силовой микроскоп “Ntegra Prima”, NT-MDT, Россия) в полуконтактном режиме с использованием кантилеверов серии NSG10 (радиус закругления иглы не более 10 нм) при частоте записи 1 Гц и разрешении изображений 512x512 пикселей. Размер участка сканирования - 0,25x0,25 мкм. Анализ изображений и расчёт шероховатости производили в программе Nova_Px v. 3.4.0.

Сканирование поверхности клеток J774 осуществлялось зондами серии PNP-DP (радиус закругления иглы ~ 10 нм) в контактном режиме при тех же условиях. Размер участка сканирования - 30x30 мкм.

2.9. Силовая спектроскопия

Для проведения силовой спектроскопии использовался атомно-силовой микроскоп “Ntegra Prima” (NT-MDT, Россия) с измерительным вкладышем AU-208

(Белозёров и др., 2021). Сила межмолекулярного взаимодействия оценивалась с использованием кантилеверов PNP-DB (NanoWorld, Швейцария) с радиусом закругления зонда около 10 нм. Кантилеверы данной серии имеют на своём основании два зонда с разной жёсткостью - 0,06 и 0,48 нН/нм. Жёсткостью кантилевера, а также скоростью отведения образца от зонда определяется скорость нагружения (LR) межмолекулярной связи, от которой в свою очередь зависит определяемая сила взаимодействия.

Силовая спектроскопия проводилась в соответствии со следующей схемой. Образец подводится к кантилеверу до момента контакта, по истечении фиксированного времени контакта образец отводится от кантилевера. Во время данного процесса выполнялась запись силовой кривой в координатах “сигнал фотодетектора (DFL) - смещение пьезостолика”, по которой происходит оценка силовых характеристик взаимодействия. Данная зависимость может быть переведена в координаты “сила - смещение пьезостолика” в соответствии со следующим уравнением:

$$F=(k/\beta)*DFL, \quad (1)$$

где F - сила взаимодействия в системе “зонд - субстрат”, нН;

k - коэффициент жёсткости консоли кантилевера, нН/нм;

β - коэффициент пропорциональности между сигналом DFL и отклонением кантилевера, который определяется как тангенс угла наклона линейного участка силовой кривой во время контакта слюды и кантилевера, нА/нм;

DFL - сигнал фотодетектора, нА.

Применительно к работе с клетками при определении коэффициента β для каждого использованного кантилевера записывались калибровочные силовые кривые взаимодействия с твёрдой поверхностью стекла.

2.10. Сканирующая электронная микроскопия

Для проведения электронной микроскопии кантилевер закрепляли на алюминиевой подложке с помощью двухстороннего токопроводящего скотча и помещали в автоматическое устройство для нанесения тонкослойных покрытий JEOL JFC-1600 (JEOL, Япония). Напыление осуществляли платиной при следующих условиях: сила тока 30 мА, время напыления 30 секунд, толщина наносимого слоя ~ 8 нм. Микроскопия проводилась на сканирующем электронном микроскопе JEOL JSM-6510 LV (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 20 кВ, размере фокусного пятна 30 % и рабочем расстоянии 11 мм в режиме глубокого вакуума.

2.11. Конфокальная и флуоресцентная микроскопия

Для проведения конфокальной и флуоресцентной микроскопии применяли методику пробоподготовки клеток, идентичную методике, использованной для блокировки клеточных рецепторов (п.2.7), за одним исключением. Вместо стадии инкубации клеток с моноклональными антителами или ЛПС клетки при тех же условиях инкубации обрабатывали конъюгатом моноклональных антител крысы к рецептору TLR4 (или CD14) с FITC (Thermo Fisher Scientific, США) в концентрации 1 мкг/мл. Покровное стекло с фиксированными клетками помещали на предметное стекло с каплей монтирующей среды Eukitt (Sigma, США). Визуализацию клеточных рецепторов проводили с помощью флуоресцентной и конфокальной микроскопии. Флуоресцентные изображения были получены в режиме проходящего света с использованием микроскопа Olympus BX51 (Olympus, Токио, Япония), оснащенного источником возбуждающего света X-cite 120Q (Excelitas Technologies) и двухрежимной флуоресцентной системой CytoViva® (Triple Pass). Конфокальные изображения были получены с помощью сканирующего лазерного конфокального микроскопа (LSM 780; Carl Zeiss, Германия), с использованием аргонового лазера (480 нм).

2.12. Твердофазный иммуноферментный анализ

Верификацию факта функционализации слюды препаратами липополисахарида и моноклональных антител проводили с использованием твердофазного иммуноферментного анализа (ТИФА). В качестве контроля использовалась аминированная с помощью APTES слюда. Нарезанные функционализированные указанными препаратами пластинки слюды (10-13 мм²) помещались в ячейки 96-луночного планшета (Greiner Bio One, Германия), которые заполнялись 200 мкл блокирующего буферного раствора (ФБР, 0,05 % Tween-20, 1 % БСА) и инкубировались в течение 1 ч при температуре 37 °С. В лунки с пластинками слюды, покрытой ЛПС, добавлялись специфические мышинные антитела МКАт2 с последующей 3-х кратной отмывкой промывочным буфером (ФБР, 0,05 % Tween-20). Во все ячейки добавлялся козий антимышиный конъюгат антител с пероксидазой (Sigma-Aldrich, США) в ФБР (0,05 % Tween-20, 0,5 % БСА). После инкубации при 37 °С в течение 1 ч и трёхкратной отмывки к пластинкам приливали 100 мкл цитрат-фосфатного буфера (рН 4,8), содержащего о-фенилендиамин (Alfa Aesar, Великобритания) в концентрации 0,4 мг/мл и 0,05 % перекиси водорода. Реакцию окисления субстрата останавливали через 20 минут добавлением 50 мкл 1н раствора серной кислоты. Перед измерениями слюдяные пластинки извлекались из ячеек планшета. Оптическую плотность (ОП₄₉₂) растворов определяли при длине волны 492 нм.

2.13. Статистическая обработка полученных результатов

Выбраковку данных АСМ, полученных в программе Nova_Px_3.4.0, осуществляли с использованием разработанного автором программного обеспечения. Обработку силовых кривых проводили в программном обеспечении, разработанном доцентом кафедры электронных вычислительных машин ВятГУ Коржавиной А. С. при участии автора.

Вычисление средних и доверительных интервалов проводили в программах LibreOffice Calc 6.1.5 (The Document Foundation) и Microsoft Excel 2013 (Microsoft). Анализ результатов силовой спектроскопии осуществляли путём определения

достоверности различий между выборками, построения диаграмм для средних значений показателей с их доверительными интервалами и построением усреднённых силовых кривых.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Первичный контакт и адгезия бактерий на тканях макроорганизма является одним из ключевых начальных этапов заболевания. Эти процессы происходят на уровне отдельных клеток (эукариотической и бактериальной) посредством их поверхностных структур. Для понимания начальных этапов протекания инфекционного процесса в организме важно изучить физиологические и биофизические аспекты процесса первичной адгезии на клеточном и молекулярном уровнях.

3.1. Оценка силовых характеристик в модельной системе “молекула - молекула”

Методика силовой спектроскопии описана в п. 2.9 «Силовая спектроскопия». В качестве объектов исследования использовались чистый кантилевер из нитрида кремния и кантилеверы, сенсibilизированные методом химической ковалентной сшивки через полиэтиленгликоль препаратами ЛПС-10 и антимышиных антител, меченных FITC,. В качестве подложки была использована слюда, покрытая антителами МКАт2 и МКАт7. Оценка неспецифической составляющей во взаимодействующей системе осуществлялась с применением чистой, аминированной и обработанной глутаровым альдегидом слюды. Подробное описание сенситинов приводится в п. 2.2 «Использованные сенситины».

3.1.1. Верификация факта сенсibilизации зонда и слюды

Факт функционализации кантилевера молекулами липополисахарида с использованием бифункционального полиэтиленгликоля подтверждали методом сканирующей электронной микроскопии. На рисунке 4 приведено СЭМ-изображение агрегатов ЛПС на поверхности иглы кантилевера.

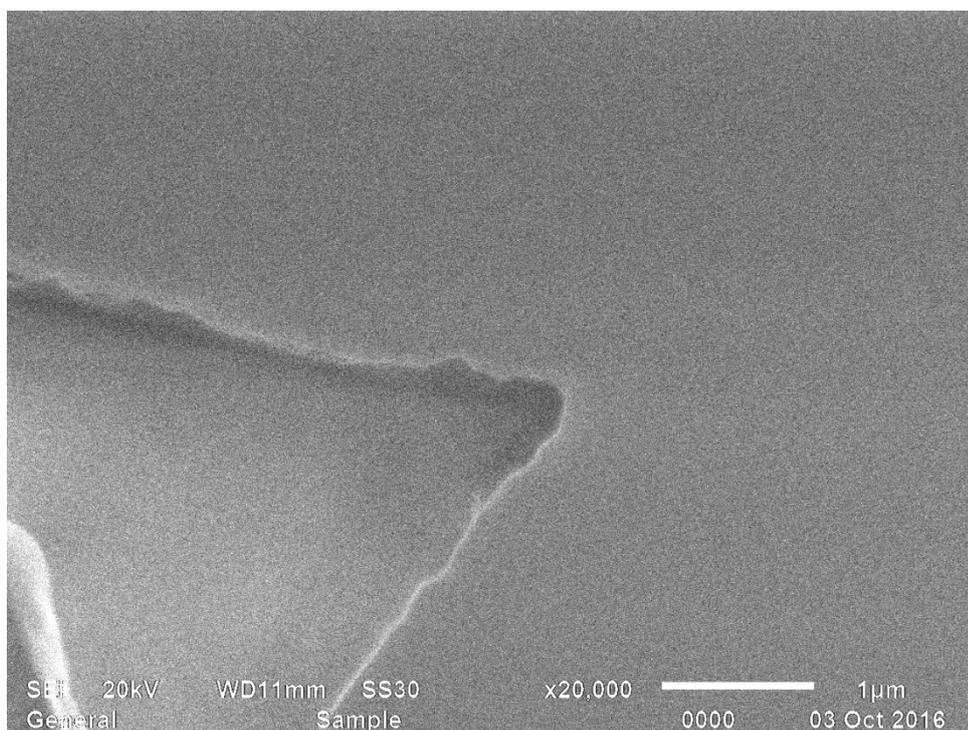


Рисунок 4 – СЭМ-изображение поверхности иглы кантилевера. Увеличение $\times 20000$, масштабная линейка - 1 мкм

Кроме того, факт иммобилизации ЛПС на зонде был косвенно подтверждён, вследствие близости химического состава поверхностей кантилевера и слюды, данными твердофазного иммуноферментного анализа при использовании для сенсбилизации ЛПС слюды: значения оптической плотности (OP_{492}) для слюды, покрытой ЛПС, и для аминированной слюды (контроль) находились в диапазоне 0,39-0,83 и 0,23-0,35, соответственно.

Валидация факта сенсбилизации слюды моноклональными антителами была проведена путем сканирования ее поверхности методом атомно-силовой микроскопии, а также постановки ТИФА. Модификация свежесколотой слюды аминными группами с использованием APTES, обработка аминированной слюды глутаровым альдегидом, а также её последующая сенсбилизация препаратами антител, приводят к изменению шероховатости функционализируемой поверхности (таблица 2). Приведенные в таблице 2 результаты указывают на то, что каждая последующая стадия обработки слюды, особенно иммобилизация антител, приводит к значительному повышению ее шероховатости по показателям Ra

(среднее арифметическое отклонение профиля) и Rz (высота неровностей профиля по десяти точкам).

Таблица 2 – Шероховатость поверхности слюды на последовательных стадиях функционализации

№	Слюда	Шероховатость	
		Ra, нм	Rz, нм
1	Чистая	0,019±0,002	0,089±0,011
2	АРТЕS	0,031±0,004	0,136±0,029
3	ГА	0,041±0,010	0,191±0,038
4	МКАт2	0,330±0,055	1,277±0,332
5	МКАт7	0,277±0,048	1,133±0,260

Рисунок 5, на котором приводятся АСМ-сканы поверхностей, иллюстрирует вышеприведённые данные по шероховатости. Предполагается, что поверхность слюды почти полностью покрыта препаратами МКАт2 и МКАт7, что отражено на АСМ-изображениях (рисунок 5Г, Д). Данное покрытие характеризуется достаточно равномерным и плотным распределением отдельных агрегатов, в основном имеющих одинаковый размер (15-20 нм). Следует отметить, что зарегистрированный линейный размер может быть завышен в боковом направлении вследствие достаточно большого радиуса закругления иглы кантилевера. Иммунизация антител на слюде была также подтверждена методом твердофазного иммуноферментного анализа: значения оптической плотности (ОП₄₉₂) для слюдяных пластинок, покрытых МКАт2 и МКАт7, находились в диапазонах 1,90-2,07 и 1,44-1,67, соответственно; ОП₄₉₂ для NH₂-модифицированной слюды (отрицательный контроль) составляла 0,256±0,063 (n=4).

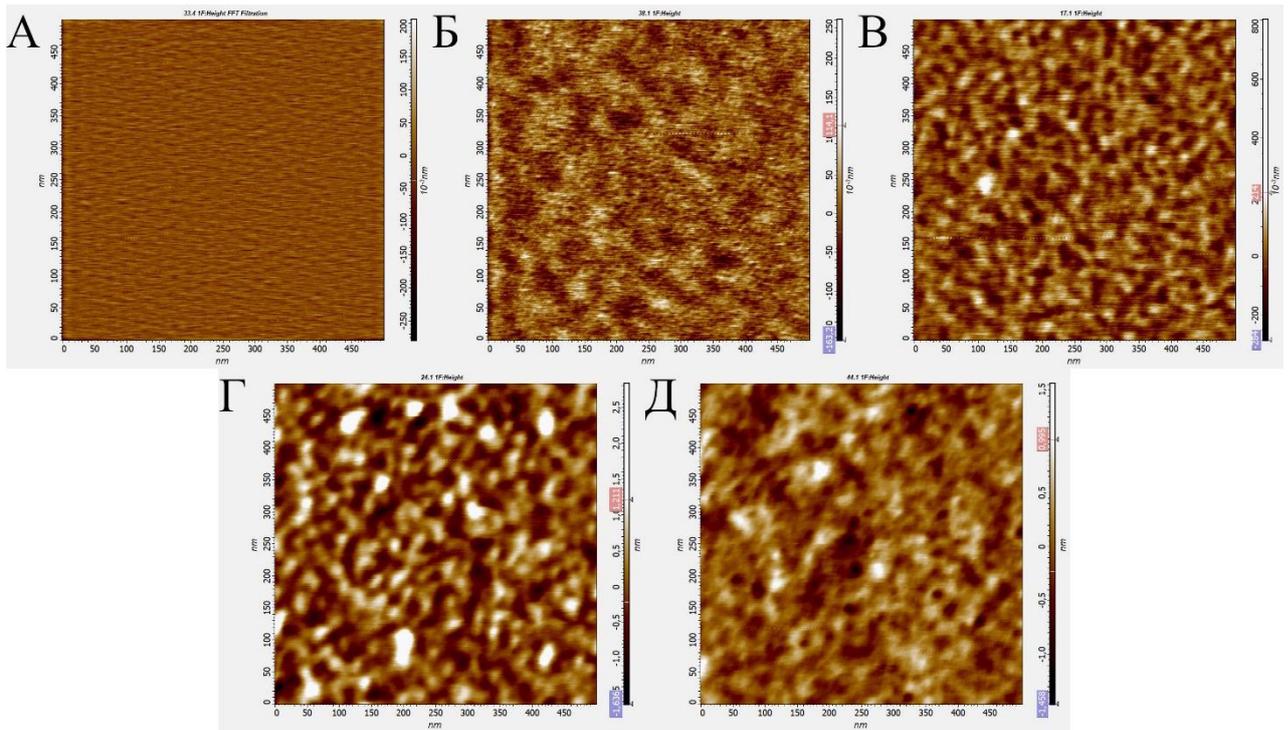


Рисунок 5 – АСМ-изображения поверхности свежесколотой слюды (А), слюды, обработанной АРТЕС (Б), обработанной последовательно АРТЕС и ГА (В), обработанной последовательно АРТЕС, ГА, МКАт2 (Г) или МКАт7 (Д) при размерах области сканирования 0,5 мкм x 0,5 мкм.

3.1.2. Обоснование критериев выбраковки силовых кривых

Важным этапом обработки экспериментальных данных силовой спектроскопии для расчёта характеристик межмолекулярного взаимодействия является отбор силовых кривых, на которых отсутствуют артефакты сигнала. Такие артефакты могут появляться вследствие сложности изучаемого образца или быть вызваны внешним воздействием на экспериментальную установку. В предварительных исследованиях нами были определены четыре основных критерия для выбраковки силовых кривых на модельной системе взаимодействия ЛПС-10 *Y. pseudotuberculosis* с моноклональными антителами.

Первым критерием является отсутствие артефактов на участке последних 100 точек, по которым определяется координата базисной линии и уровень шума, а также его горизонтальность (первый критерий, рисунок 6А). Оценка соответствия силовой кривой данному критерию проводилась путём сглаживания описанного выше участка, и сравнения координаты каждой точки сглаживания со средним

значением сигнала DFL для этого участка (модуль разницы координат). Предельно допустимым значением отклонения базисной линии от горизонтальной было принято считать 0,03 нН.

Вторым значимым участком силовой кривой отведения являются первые 40 точек. Данный участок используется при расчёте коэффициента пропорциональности между сигналом фотодетектора и отклонением кантилевера (β). Важно, чтобы на этом участке была строго линейная зависимость между сигналом DFL и смещением пьезостолика (второй критерий, рисунок 6Б). Для оценки соответствия силовой кривой данному критерию программа выбраковки производила разделение указанного выше участка на четыре фрагмента по 10 точек каждый с последующим расчётом усреднённых координат для каждого из фрагментов. Путём последовательного соединения полученных усреднённых координат генерировались три прямые линии, для которых программа определяла тангенс угла наклона. Полученные значения тангенса сравнивались между собой для определения возможного изменения угла наклона в начале, середине и конце изучаемого участка. Отклонение тангенса угла наклона при сравнении каждого из участков не должно превышать 5 %.

Третьим критерием выбраковки является наличие скачков сигнала на линейном участке от начала силовой кривой отведения до момента пересечения с базисной линией (рисунок 6В). Данные артефакты могут быть отражением событий, происходящих при взаимодействии зонда и образца в процессе отведения пьезостолика, например, перемещение иглы кантилевера по рельефной поверхности субстрата. Если амплитуда таких скачков превышала 0,03 нН, то силовая кривая не учитывалась при дальнейшем расчёте характеристик взаимодействия.

Разрыв последней связи означает, что силовая кривая вышла на базисную линию, то есть на участок, где отсутствуют силы взаимодействия между зондом и подложкой. В этот момент кантилевер находится в свободном состоянии. Любые отклонения сигнала от базисной линии после последнего отрыва считаются артефактами (четвёртый критерий, рисунок 6Г). Наличие артефактов на участке от

момента выхода сигнала на базисную линию до конечной точки базисной линии может привести к некорректному определению силовых характеристик при последующей обработке сигнала. Так, силовая кривая может соответствовать первому критерию (горизонтальность последних 100 точек), т.е. по данному участку можно определить координату базисной линии, однако, эта координата будет смещена относительно реальной координаты базисной линии в момент последнего отрыва, что приведёт к завышению или занижению определяемой силы.

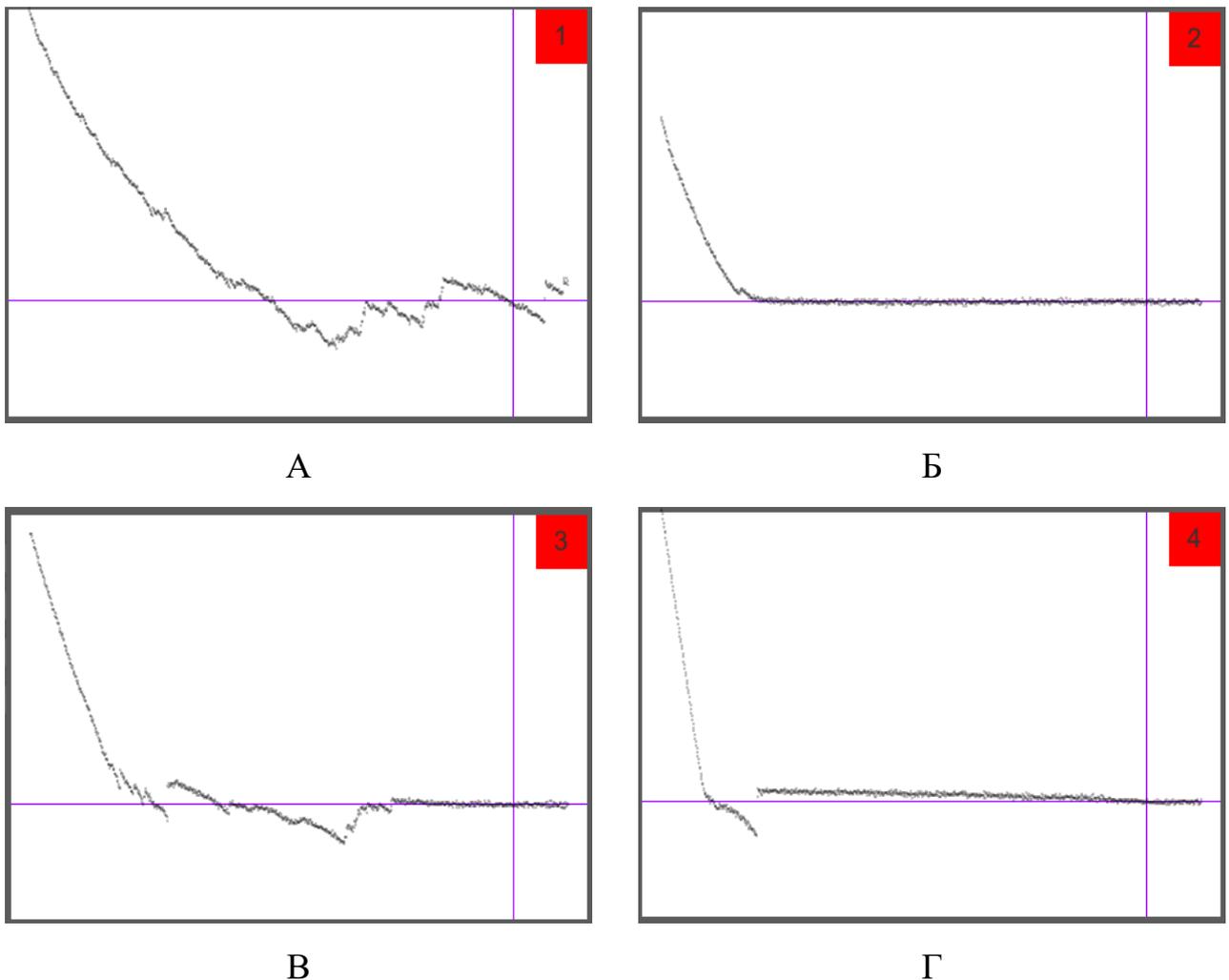


Рисунок 6 – Примеры силовых кривых, имеющих артефакты: (А) нелинейность последних 100 точек, (Б) нелинейность первых 40 точек, (В) наличие событий (скачков сигнала) на участке от первой точки до пересечения с базисной линией, (Г) отклонение базисной линии от горизонтальности после разрыва последней связи.

Следует отметить, что при обработке силовых кривых, полученных при работе с клетками, а не с системой «молекула – молекула» использование критериев выбраковки 2 и 3 ограничено. Сложная морфология клеток, мягкость их поверхности, а также наличие протяжённых структур приводят к появлению артефактов на силовых кривых на начальных этапах отведения кантилевера от клетки, которые определяют существо двух вышеуказанных критериев.

Для осуществления процесса выбраковки силовых кривых в автоматическом режиме, было разработано программное обеспечение. Исходные силовые кривые загружались в программу и оценивались по всем четырём критериям в представленном выше порядке. Если силовая кривая соответствовала первому критерию, то она проверялась на соответствие второму и так далее. В результате формировался файл, содержащий данные о силовых кривых, подходящих для последующего определения силовых характеристик.

3.1.3. Апробация критериев оценки силы межмолекулярных взаимодействий

Принципиальная схема проведения силовой спектроскопии на модельной системе “ЛПС-МКАт” приведена на рисунке 7А. Пример силовой кривой, записанной в ходе одного цикла подведения и отведения слюды, покрытой МКАт₂, от ЛПС-кантилевера, представлен в координатах “сила - смещение пьезостолика” на рисунке 7Б. В качестве основных критериев оценки силы межмолекулярного взаимодействия использовались: амплитуда первого отрыва (3); амплитуда последнего отрыва (4); дистанция, на которой произошёл последний отрыв от момента контакта слюды и кантилевера (5); работа, которую необходимо совершить для разрыва всех образовавшихся связей и которая определяется как площадь между кривой отведения и базисной линией (6); длина ассоциата, под которой понимается расстояние от острия зонда до поверхности подложки в момент разрыва последней связи (Белозёров и др., 2021); средняя амплитуда всех отрывов; максимальная адгезия, определяемая как расстояние от самой нижней точки силовой кривой до базисной линии; среднее количество отрывов на один график;

количество графиков, имеющих как минимум один разрыв связей. На рисунке 7Б максимальная адгезия совпадает с амплитудой первого отрыва (3).

Для определения амплитуды разрыва связей на силовой кривой искались локальные минимумы. Если для такого минимума скачок сигнала в положительную сторону по ходу записи силовой кривой превышал средний фоновый шум базисной линии (1) в 4 раза, то такое событие считалось за разрыв связи. В таком случае сила разрыва связи определялась как разница между координатами минимума и базисной линии.

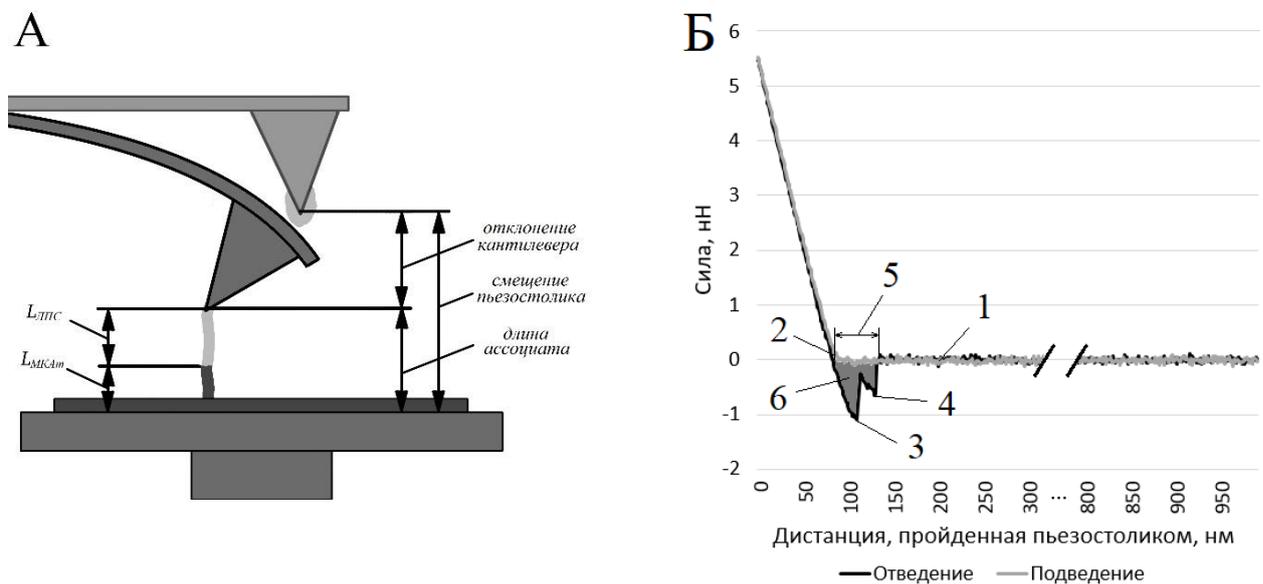


Рисунок 7 – (А) Принципиальная схема измерения силовых характеристик межмолекулярного взаимодействия методом АСМ. (Б) Пример силовой кривой взаимодействия «МКАт2 – ЛПС», где 1 - базисная линия, 2 - момент контакта зонда с субстратом, 3 - момент разрыва первой связи, совпадающий с максимальной адгезией, 4 – момент разрыва последней связи, 5 - дистанция последнего отрыва, 6 - работа сил адгезии (площадь)

Взаимодействие молекул приводит к образованию протяжённых ассоциатов, которые могут растягиваться и расплетаться во время отведения кантилевера от образца. Последний отрыв на силовой кривой показывает, в какой момент отведения произошёл разрыв данного ассоциата при его максимальной

протяжённости. Под длиной ассоциата понимается расстояние между концом иглы кантилевера и поверхностью подложки (рисунок 7А) в момент разрыва последней связи. В длину ассоциата входят как протяжённость взаимодействующих молекул, так и протяжённость используемых линкеров.

Силовая кривая не дает непосредственной информации о длине ассоциата, однако содержит информацию о смещении пьезостолика с образцом и отклонении кантилевера. Зная коэффициент пропорциональности между сигналом фотодетектора и отклонением кантилевера (β), а также зная амплитуду последнего отрыва, можно рассчитать на какое расстояние отклонился кантилевер. Так, длина ассоциата будет определяться как разница между расстоянием, пройденным пьезостоликом от момента контакта кантилевера с подложкой до момента последнего отрыва (участок 5 на рисунке 7Б), и расстоянием, на которое отклонился кантилевер.

3.1.4. Определение силы взаимодействия ЛПС с антителами, иммобилизованными на слюде с использованием NHS и EDC

Для оценки силовых характеристик взаимодействия ЛПС с антителами были проведены три серии экспериментов при разных условиях. Во всех экспериментах оценивались силовые характеристики взаимодействия между ЛПС-10 и антителами, специфическими к О-боковым цепям липополисахарида (МКАт2). В качестве отрицательного контроля использовалась слюда, покрытая антителами, специфическими к белковому эпитопу внешней мембраны *Y. pseudotuberculosis* (МКАт7).

В первой серии опытов оценку силовых характеристик взаимодействия производили при следующих условиях: скорость нагружения межмолекулярной связи - 72 нН/с; время контакта - 5 и 60 секунд; концентрация препарата ЛПС для функционализации кантилевера - 100 мкг/мл; концентрация антител для функционализации слюды - 100 мкг/мл; все измерения проводились в ФБР при комнатной температуре.

Результаты первой серии измерений силовых характеристик с использованием АСМ приведены в таблице 3. При данных условиях проведения эксперимента были установлены достоверные различия ($p > 0,99$) между амплитудой первого отрыва, работой сил адгезии и средней амплитудой всех отрывов, оцененными для антител двух типов, при 5 секундном контакте. На наличие специфической компоненты во взаимодействии “ЛПС - МКАт2” при этом периоде контакта может указывать также большее количество отрывов на одну силовую кривую в сравнении с взаимодействием “ЛПС - МКАт7”. Однако, увеличение времени контакта приводит к тому, что различия между силовыми характеристиками для двух препаратов антител стираются, а некоторые силовые характеристики, такие как амплитуда первого отрыва и работа, становятся значительно выше для неспецифического взаимодействия. Предположительно, данный факт связан с нарастанием вклада неспецифического компонента в изучаемое взаимодействие, что может являться следствием увеличения количества и насыщения неспецифических межмолекулярных связей. Возможно, для формирования специфических связей, в отличие от неспецифических, достаточно короткого промежутка времени, исчисляемого несколькими секундами. Таким образом, при длительном времени контакта взаимодействующих поверхностей, неспецифическая компонента может преобладать над специфической, что делает невозможным оценку различий между препаратами.

Таблица 3 – Силовые характеристики взаимодействия липополисахарида с антителами для времени контакта 5 и 60 с ($X_{cp} \pm I_{99}$)

Слюда (время контакта)	Амплиту- да первого отрыва, нН	Амплиту- да послед- него отрыва, нН	Работа сил адгезии, Дж, $\times 10^{-15}$	Средняя амплиту- да всех отрывов, нН	Среднее количе- ство отрывов	Число опытов
МКА _{T2} (5с)	1,058± 0,094	0,424± 0,041	0,83± 0,10	0,814± 0,042	3,23± 0,28	366
МКА _{T2} (60с)	1,440± 0,158	0,709± 0,098	1,82± 0,46	1,282± 0,084	4,00± 0,57	225
МКА _{T7} (5с)	0,669± 0,039	0,443± 0,033	0,51± 0,09	0,599± 0,027	2,40± 0,18	506
МКА _{T7} (60с)	1,821± 0,129	0,740± 0,110	2,18± 0,25	1,214± 0,062	4,11± 0,32	334

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

Как было показано в первой серии опытов, время контакта взаимодействующих поверхностей значительно влияет на возможность оценки специфичности взаимодействия. При проведении второй серии экспериментов время взаимодействия было снижено до 1 и 5 секунд. Условия проведения силовой спектроскопии для данной серии экспериментов аналогичны первой, за исключением скорости нагружения межмолекулярной связи - 60 нН/с.

Результаты второго эксперимента по силовой спектроскопии взаимодействия ЛПС с антителами приведены в таблице 4. Для пятисекундного контакта были показаны существенные различия ($p>0,99$) по всем критериям оценки силовых характеристик между специфическим и неспецифическим взаимодействием.

Достоверные различия ($p > 0,99$) наблюдаются между взаимодействующими парами «ЛПС - МКАт2» и «ЛПС - МКАт7» также и при односекундном контакте для работы сил адгезии, средней амплитуды всех отрывов и количества отрывов.

Таблица 4 – Силовые характеристики взаимодействия липополисахарида с антителами для времени контакта 1 и 5 с ($X_{cp} \pm I_{99}$)

Слюда (время контакта)	Амплиту- да первого отрыва, нН	Амплиту- да послед- него отрыва, нН	Работа сил адгезии, Дж, $\times 10^{-15}$	Средняя амплиту- да всех отрывов, нН	Среднее количе- ство отрывов	Число опытов
МКАт2 (1с)	$0,685 \pm$ 0,052	$0,428 \pm$ 0,027	$0,66 \pm$ 0,08	$0,627 \pm$ 0,026	$2,70 \pm$ 0,14	686
МКАт2 (5с)	$1,748 \pm$ 0,089	$0,518 \pm$ 0,042	$2,28 \pm$ 0,18	$1,158 \pm$ 0,036	$4,68 \pm$ 0,19	672
МКАт7 (1с)	$0,665 \pm$ 0,030	$0,403 \pm$ 0,020	$0,39 \pm$ 0,03	$0,564 \pm$ 0,018	$2,32 \pm$ 0,11	951
МКАт7 (5с)	$1,020 \pm$ 0,042	$0,465 \pm$ 0,026	$0,97 \pm$ 0,07	$0,778 \pm$ 0,021	$3,45 \pm$ 0,14	888

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

Условия проведения третьей серии экспериментов были аналогичны второй серии, за исключением сниженной скорости нагружения межмолекулярной связи - 30 нН/с. Это было сделано с целью выявления более тонких различий в силе межмолекулярных взаимодействий.

Результаты, приведенные в таблице 5, показывают, что все силовые характеристики для системы «ЛПС - МКАт2» превышают таковые для «ЛПС -

МКАт7». Значимые различия ($p > 0,99$) были установлены для всех пяти критериев (амплитуда первого разрыва, амплитуда последнего разрыва, средняя амплитуда всех разрывов, работа сил адгезии и количество разрывов) при времени контакта 1 и 5 с. Различия в силовых характеристиках для взаимодействия ЛПС с МКАт2 и МКАт7 при времени контакта 1 с для двух критериев (сила последнего разрыва и средняя сила всех разрывов) были значимыми с вероятностью 94,8 % и 98,4 %, соответственно. Полученные данные указывают на наличие специфического компонента во взаимодействии между ЛПС на зонде и МКАт2 на слюде. Значения для всех пяти оцениваемых параметров значительно возрастали ($p > 0,99$) при повышении времени контакта с 1 до 5 с (таблица 5) для обоих взаимодействующих пар: «ЛПС - МКАт2» и «ЛПС - МКАт7».

С увеличением времени контакта также повышается и вероятность связывания сенсibilизированного ЛПС зонда и моноклональных антител на субстрате, то есть снижается доля хронограмм, отражающих отсутствие взаимодействия. Так, для 1 и 5-секундного контакта вероятность связывания ЛПС с МКАт2 составила 68,4 и 86,9 %, соответственно, и для взаимодействия ЛПС с МКАт7 - 56,9 и 71,6, соответственно (эти данные в таблице 5 не представлены). Из приведённых данных видно, что вероятность связывания ЛПС со специфическими антителами выше, чем с неспецифическими.

Стоит отметить, что снижение скорости нагружения межмолекулярной связи приводит к снижению регистрируемых силовых характеристик, что следует из сравнения результатов второго и третьего экспериментов.

Таблица 5 – Силовые характеристики взаимодействия липополисахарида с антителами при скорости нагружения 30 нН/ с ($X_{cp} \pm I_{99}$)

Слюда (время контакта)	Амплитуда первого отрыва, нН	Амплитуда последнего отрыва, нН	Работа сил адгезии, Дж, $\times 10^{-15}$	Средняя амплитуда всех отрывов, нН	Среднее количество отрывов	Число опытов
МКА _{T2} (1с)	0,286± 0,013	0,240± 0,017	0,14± 0,03	0,313± 0,015	1,93± 0,13	770
МКА _{T2} (5с)	0,358± 0,015	0,275± 0,016	0,19± 0,02	0,349± 0,011	2,41± 0,13	1134
МКА _{T7} (1с)	0,187± 0,033	0,222± 0,017	0,06± 0,02	0,263± 0,028	1,75± 0,14	802
МКА _{T7} (5с)	0,282± 0,013	0,248± 0,015	0,13± 0,03	0,328± 0,014	2,03± 0,15	892

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

Результаты описанных выше экспериментов показали, что наиболее подходящими условиями для проведения силовой спектроскопии могут являться относительно низкая скорость нагружения межмолекулярной связи и непродолжительное время контакта. Проведение эксперимента при данных условиях позволило выявить различия между специфическим и неспецифическим взаимодействием в системе “антиген - антитела”. Снижение скорости нагружения межмолекулярной связи позволяет производить оценку силы взаимодействия в условиях, приближенных к равновесным (Zhang et al., 2002), а небольшое время контакта позволяет уменьшить вклад неспецифической составляющей в регистрируемый сигнал.

3.1.5. 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 препаратом ЛПС-10. В качестве подложки использовалась чистая слюда, слюда, аминированная с помощью АPTES, а также аминированная слюда с последующей обработкой ГА. На слюду, покрытую глутаровым альдегидом, наносили антитела, комплементарные O-боковым цепям ЛПС (МКАт2) и, в качестве контроля, антитела, не взаимодействующие с ЛПС (МКАт7). Таким образом, были сформированы 10 взаимодействующих пар.

Эксперимент проводился при следующих условиях: скорость нагружения межмолекулярной связи - 30 нН/с; время контакта зонда и подложки - 1 секунда; концентрация препарата ЛПС для функционализации кантилевера - 100 мкг/мл; концентрация антител для функционализации слюды - 100 мкг/мл; все измерения проводились в ФБР при комнатной температуре.

Результаты силовой спектроскопии представлены в таблице 6 в виде средних значений для силы последнего отрыва, работы сил адгезии, средней силы всех отрывов, максимальной адгезии, длины ассоциата, дистанции последнего отрыва, количества отрывов и вероятности связывания. На рисунках 8 и 9 представлены усреднённые хронограммы сигнала фотодетектора в координатах “сила - расстояние, пройденное пьезостоликом” для всех взаимодействующих пар. За точку, относительно которой применялось усреднение, был принят момент контакта слюды и кантилевера (точка пересечения силовой кривой базисной линии). Данные для силы, необходимой для разрыва последней связи, и работы сил адгезии представлены также в виде диаграмм на рисунках 10 и 11.

Таблица 6 – 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 отведений с отрывами, %	Количество опытов*
		Сила последнего отрыва, нН	Работа сил адгезии, Дж $\times 10^{-15}$	Средняя сила всех отрывов, нН	Максимальная адгезия, нН	Длина ассоциатива, нм	Дистанция последнего отрыва, нм	Среднее количество отрывов					
«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			
Функционализированный ЛПС	МКАт2	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			
	МКАт7	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			
Функционализированный 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			
	МКАт2	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			
Функционализированный ЛПС	МКАт7	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 ($p=0,99$).

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

Как видно из рисунков 8 и 9, все взаимодействия чистой минеральной поверхности зонда с различными вариантами слюды являются маловыраженными в сравнении с таковыми для функционализированного кантилевера. Последовательная обработка чистой слюды APTES, а затем аминированной слюды глутаровым альдегидом не приводит к значительному изменению определяемых характеристик, однако, увеличение длины ассоциата и количества регистрируемых разрывов связей на одну силовую кривую указывает на усложнение взаимодействующей системы. Последующая обработка слюды моноклональными антителами приводит к снижению ($p > 0,99$) регистрируемой силы по показателям силы разрыва последней связи, средней силы всех отрывов и максимальной адгезии, что может быть связано с экранированием антителами неспецифических взаимодействий между минеральными поверхностями, например, гидрофобных, электростатических и др. Подобный эффект экранирования неспецифического взаимодействия минеральных поверхностей наблюдается при сравнении взаимодействия двух кантилеверов (чистого и покрытого ЛПС) с чистой слюдой, где сенсбилизация зонда препаратом ЛПС приводит к снижению регистрируемых силовых характеристик.

В отличие от чистого кантилевера, функционализированный кантилевер вызывает существенно более выраженное взаимодействие с субстратами. Аминирование слюды, так же как и последующая обработка аминированной слюды ГА, приводит к значительному увеличению ($p > 0,99$) регистрируемой силы связи и усложнению регистрируемого сигнала (таблица 6, рисунок 8Б) для ЛПС-кантилевера. Данный факт может объясняться в том числе тем, что выделенные из бактериальной массы препараты ЛПС склонны к образованию агрегатов и, в зависимости от его концентрации и состава раствора, могут находиться в виде высокомолекулярных структур различного размера и формы (Santos et al., 2003). Данные о сильном неспецифическом взаимодействии ЛПС с поверхностью аминированной слюды согласуются с результатами работы Lu Q. et al. (Lu et al., 2011), которые при помощи установки для изучения поверхностных сил (SFA) показали, что сила взаимодействия в системе “ЛПС - аминированная слюда”

значительно превышает взаимодействие в системе “ЛПС - немодифицированная слюда”. Предположительно, между аминными группами и молекулой ЛПС образуется большое количество одновременно задействованных связей кислотной природы, обусловленной присутствием на молекулах ЛПС свободных фосфатных, карбоксильных и гидроксильных групп.

Природа взаимодействия липополисахарида с альдегидными группами не совсем ясна. Считается, что углеводы слабо взаимодействуют с альдегидами, однако, следует отметить, что последние могут, в порядке убывания силы связи, взаимодействовать с ϵ -, α -, вторичными аминными группами и гидроксильными функциональными группами (Migneault et al., 2004). Полисахаридная часть ЛПС включает значительное количество гидроксильных групп, что, при наличии альдегидных групп глутарового альдегида на поверхности слюды, может приводить к образованию множества слабых связей на коротких дистанциях, которые на силовой кривой будут регистрироваться как единичные или множественные высокоамплитудные разрывы связей. Можно также предположить, что на оцениваемую силу взаимодействия между ЛПС и ГА существенно влияет взаимодействие альдегида с аминными группами, находящимися в белковой примеси в препарате ЛПС. Используемый в работе препарат ЛПС включал в качестве прочно связанной примеси 1,3 % белка.

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 неспецифического связывания ЛПС с альдегидными и/или аминными группами на поверхности сенсibilизированного антителами субстрата. Вместе с этим, 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 весомом вкладе специфической составляющей во взаимодействие “ЛПС - МКАт2”.

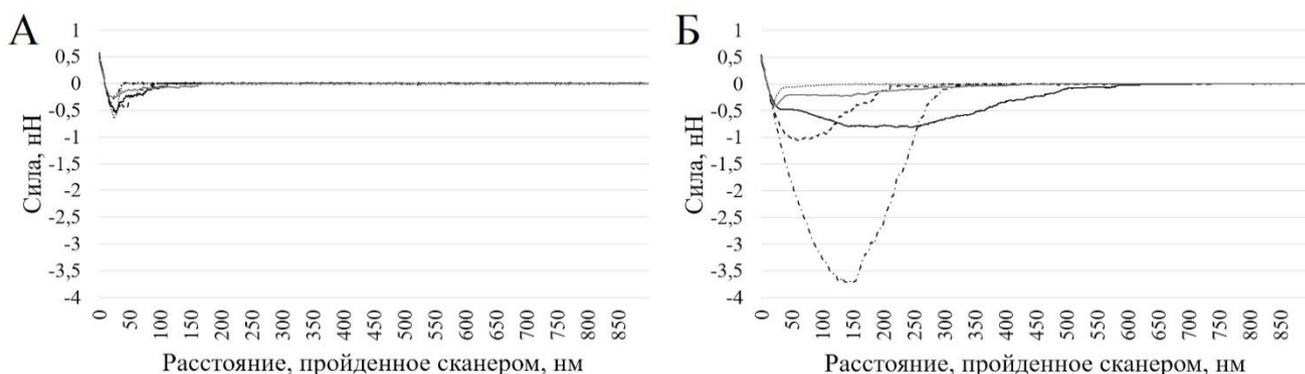


Рисунок 8 – Усреднённые хронограммы сигнала отведения слюды от чистого кантилевера (А) и кантилевера, покрытого ЛПС (Б). Хронограммы взаимодействия кантилеверов выполнены в виде точек (чистая слюда), пунктирной линии (слюда «АРТЕS»), штрихпунктирной линии (слюда «ГА»), сплошной черной линии (слюда «МКАт2») и сплошной серой линии (слюда «МКАт7»)

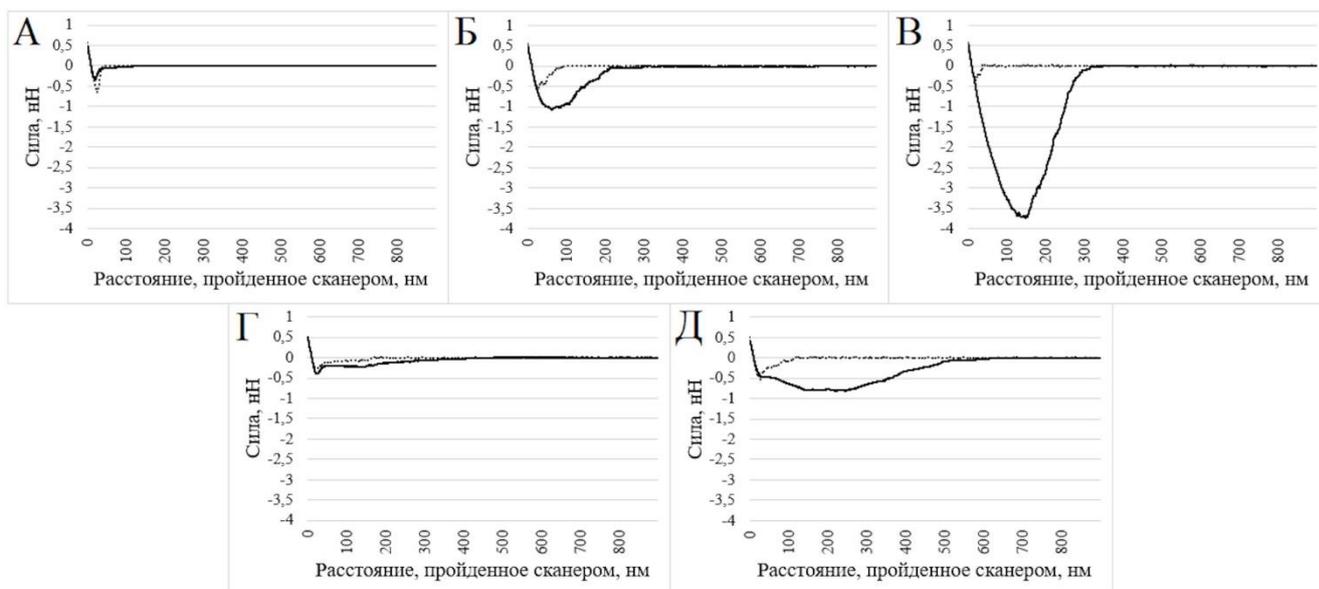


Рисунок 9 – Усреднённые хронограммы сигнала отведения чистой слюды (А) и слюды, последовательно обработанной препаратами АРТЕС (Б), глутарового альдегида (В), МКАт7 (Г) и МКАт2 (Д), от чистого кантилевера и кантилевера, функционализированного ЛПС. Хронограммы взаимодействия выполнены в виде точек и сплошной линии для кантилеверов чистого и функционализированного ЛПС соответственно

Наиболее часто используемыми и показательными силовыми характеристиками для оценки специфичности межмолекулярного взаимодействия являются амплитуда последнего отрыва и работа сил адгезии (Willemsen et al., 1998; El-Kirat-Chatel, Dufrene, 2016). Амплитуда последнего отрыва, как предполагается, может содержать информацию о специфическом взаимодействии, в том числе на мономолекулярном уровне, а работа сил адгезии служит характеристикой взаимодействия для всей системы, включающей специфические и неспецифические связи.

На рисунках 10 и 11 приведены диаграммы для двух указанных выше силовых характеристик, описывающих все 10 типов взаимодействия. Применительно к чистому кантилеверу влияние процедур обработки кантилевера 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 значения показателей силовых характеристик для взаимодействия “ЛПС - МКАт2”, чем для чисто неспецифического “ЛПС - МКАт7”, что также указывает на участие специфической компоненты в процессе связывания ЛПС с МКАт2. Также на это указывают дополнительные силовые характеристики, например, максимальная адгезия, длина ассоциата, количество отрывов на одну силовую кривую и вероятность связывания (таблица 6). На основе полученных данных по взаимодействию ЛПС с МКАт7 можно предположить, что сила неспецифического связывания может быть сопоставима с таковой для специфического.

Одним из потенциальных источников неспецифических взаимодействий могут являться сами сенситины. Можно предположить, что молекула ЛПС “расплетается” под действием приложенной силы. Данный процесс может происходить, если сила, требуемая для разрыва связей между ЛПС-кантилевером и слюдой, превышает силу, необходимую для поддержания ЛПС в агломерированном состоянии. В таком случае происходит разрыв неспецифических нековалентных связей внутри молекулы ЛПС. Это следует из сравнения длины ассоциата для взаимодействующих пар, имеющих большую силу взаимодействия (“ЛПС -

АРТЕС”, ”ЛПС - ГА” и “ЛПС - МКАт2”), с длиной ассоциата для слабо взаимодействующих пар (“ЛПС - чистая слюда” и “ЛПС - МКАт7”).

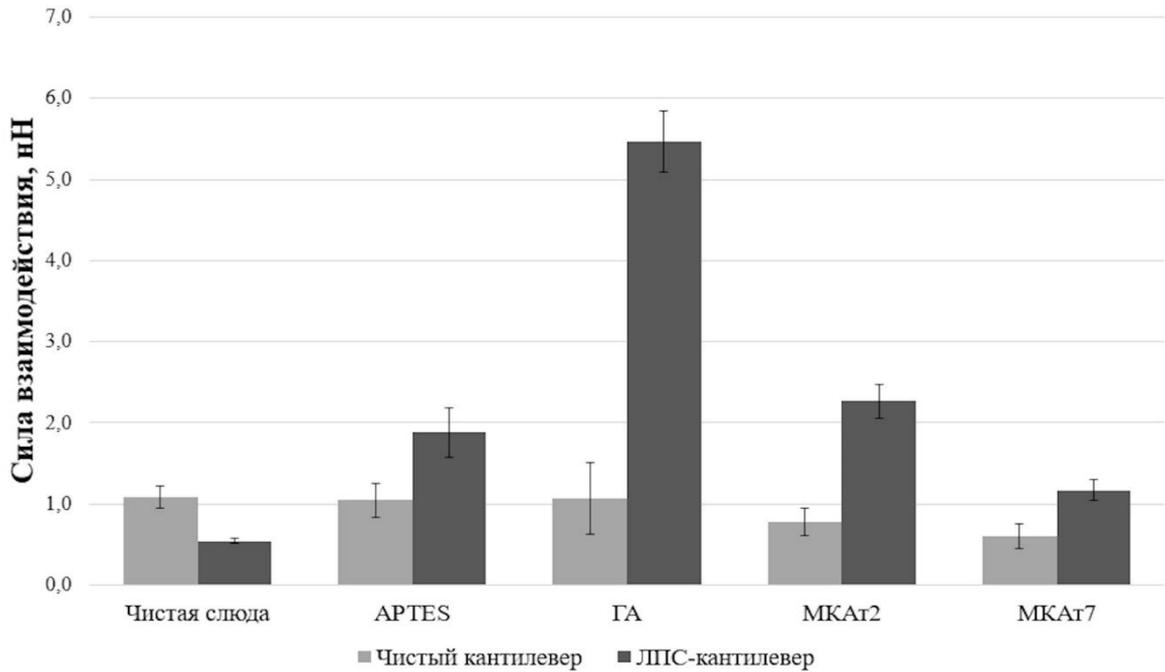


Рисунок 10 – Средняя сила разрыва последней связи. Доверительные интервалы указаны для $p=0,99$

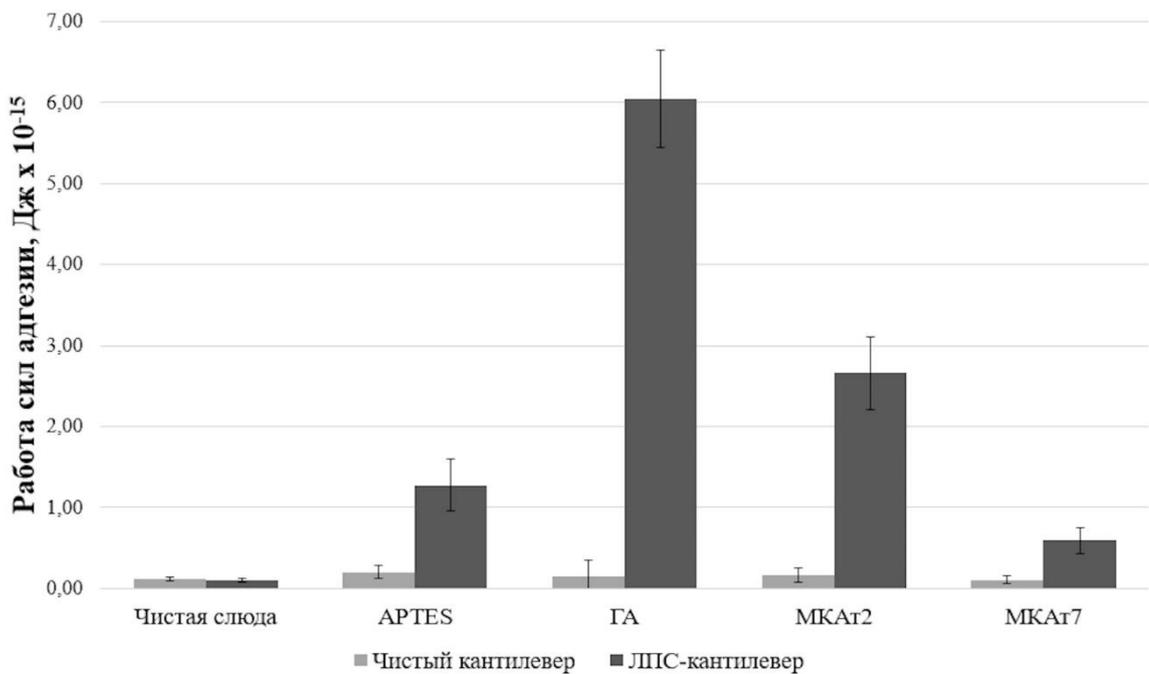


Рисунок 11 – Площадь между кривыми подведения и отведения (работа сил адгезии). Доверительные интервалы указаны для $p=0,99$

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. В частности, неспецифическое влияние на оцениваемую силу может усиливаться за счёт связывания сенситинов с активными аминными или альдегидными группами, или за счёт процесса “расплетания” сложных молекул, таких как ЛПС. Было установлено, что сила неспецифического связывания может превышать или быть сопоставимой с силой специфического связывания. Однако, в то же время было показано, что для подобных друг другу взаимодействующих систем, одна из которых включает специфическую компоненту (например, ЛПС - специфические и ЛПС - гетерологичные антитела), по всем силовым характеристикам, использованным в исследовании, регистрируется более выраженное взаимодействие для первой из указанных модельных систем. Учитывая вышеизложенное, количественное определение силовых характеристик, которые соответствовали бы только специфическому взаимодействию “молекула антигена - молекула антител”, представляется маловероятным вследствие неотъемлемого влияния неспецифических факторов на разрываемую связь. Степень влияния этих факторов и их природа определяются условиями проведения эксперимента.

3.1.6. 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”. Подбор модельной системы основан на простоте взаимодействующих молекул. Отсутствие крупных полимерных агрегатов, которые присутствуют в препарате ЛПС, позволяет повысить вероятность выявления единичных взаимодействий «молекула – молекула», что упрощает подбор подходящих условий проведения эксперимента и уточняет

перечень критериев, по которым может определяться сила взаимодействия в более сложных системах, таких как «антиген – эукариотическая клетка».

Как было указано ранее в главе “Обзор литературы”, одним из факторов, влияющих на определяемую силу взаимодействия, является время контакта зонда и подложки. В этих экспериментах антитела МКАт7 были ковалентно иммобилизованы на поверхности слюды с использованием EDC и NHS, антимышиные антитела ковалентно связывались с кантилевером через бифункциональный ПЭГ. В таблице 7 приведены данные силовой спектроскопии для взаимодействующих пар “МКАт7 - антимышиные антитела” и “APTES - антимышиные антитела” при времени контакта 1, 5 и 60 секунд. Все измерения проводились в фосфатном буферном растворе при комнатной температуре. Скорость нагружения межмолекулярной связи была равной 36 нН/с. Концентрация препаратов антител, использованных для функционализации кантилевера и слюды, - 100 мкг/мл.

Таблица 7 – Влияние времени контакта зонда, покрытого антимишными антителами, и подложки на определяемые силовые характеристики ($X_{cp} \pm I_{99}$)

Слюда	Время кон-такта, с	Амплитуда первого отрыва, нН	Амплитуда последнего отрыва, нН	Работа сил адгезии, Дж, $\times 10^{-15}$	Длина ассоци-ата, нм	Средняя амплитуда всех отрывов, нН	Среднее количество отрывов	Количество отведений с отрывами, %	Число опы-тов
МКАт7	1	0,570±0,055	0,504±0,050	0,12±0,04	45,2±9,3	0,550±0,047	1,30±0,13	50,8	152
	5	0,587±0,040	0,517±0,041	0,23±0,06	48,6±10,2	0,611±0,044	1,51±0,15	67,8	249
	60	0,810±0,055	0,601±0,061	0,44±0,07	82,6±11,6	0,724±0,040	2,25±0,23	88,4	282
АРТЭС	1	1,538±0,171	1,265±0,216	0,32±0,06	19,7±8,9	1,283±0,158	1,40±0,14	100,0	99
	5	7,866±1,081	7,863±1,083	6,12±1,47	8,5±1,1	7,794±1,085	1,01±0,028	100,0	91
	60	16,294±1,765	16,294±1,765	26,05±5,25	3,7±6,6	16,294±1,765	1,00±0,00	100,0	63

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

Анализ представленных в таблице 7 данных показывает, что увеличение времени контакта сенсibilизированных поверхностей приводит к увеличению силы взаимодействия, что предположительно связано, во-первых, с увеличением количества образующихся связей, во-вторых, с процессом насыщения межмолекулярных связей и, в-третьих, с тем, что большее время контакта позволяет взаимодействующим частям молекул ближе подойти друг к другу в пространстве (Hoffmann et al., 2011; Li et al., 2013; Wickham et al., 1990). Это также подтверждается увеличением среднего количества разрывов связей на силовую кривую и увеличением вероятности связывания.

Стоит отметить, что сила неспецифического взаимодействия между кантилевером и аминированной поверхностью субстрата возрастает в несколько раз при увеличении времени контакта. Как показывают приведённые в таблице 7 данные, сила неспецифического связывания функционализированного кантилевера с аминными группами APTEs может превосходить специфическое взаимодействие между антигеном и антителом. Данный факт может объясняться наличием большого количества одновременно участвующих во взаимодействии аминных групп и малой протяжённостью молекул APTEs, что подтверждается данными о длине ассоциата. Вследствие невысокой протяжённости APTEs аминные группы взаимодействуют с антителами на коротких дистанциях, что приводит к образованию множества непротяжённых связей, разрыв которых может регистрироваться на силовой кривой как акт разрыва одной связи. Это также подтверждается малым количеством регистрируемых разрывов связей на одну силовую кривую, которое уменьшается при увеличении времени контакта и, соответственно, при увеличении количества образовавшихся связей, действующих на коротких дистанциях.

В случае проведения силовой спектроскопии с использованием линкеров для иммобилизации биологических молекул на зонде, первый отрыв, если он не единственный, принято считать чисто неспецифическим, в то время как последний отрыв - чисто специфическим (Willemsen et al., 1998; Krasnoslobodtsev et al., 2007) или содержащим специфическую компоненту. При сравнении данных, полученных

для специфического взаимодействия “МКАт7 - антимышинные антитела” при 1 и 60 секундном контактах, увеличение амплитуды разрыва первой связи составило 42,3 %, в то время как для амплитуды последнего отрыва данное увеличение составило 19,2 %. Предположительно, большее изменение амплитуды первого отрыва при увеличении времени контакта может быть связано с наличием незаблокированных реакционноспособных аминных групп АРТЕS, взаимодействующих с сенситином кантилевера, которые обуславливают нарастание во времени неспецифической составляющей во взаимодействующей системе.

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

Другим важным фактором, влияющим на определяемую силу взаимодействия, является скорость нагружения межмолекулярной связи. Для оценки влияния данного фактора использовалась модельная система “МКАт7 - антимышинные антитела”, на которой определялись силовые характеристики при трёх значениях скорости нагружения связи - 6, 30 и 60 нН/с. Все измерения проводились в фосфатном буферном растворе при комнатной температуре. Время контакта - 5 с. Концентрация препаратов антител, использованных для функционализации кантилевера и слюды, - 100 мкг/мл.

Результаты проведённого исследования представлены в виде средних значений силы первого и последнего разрывов связей, работы сил адгезии и средней амплитуды всех отрывов (таблица 8).

Таблица 8 – Влияние скорости нагружения межмолекулярной связи на определяемые силовые характеристики ($X_{cp} \pm I_{99}$)

Скорость нагружения связи, нН/с	Амплитуда первого отрыва, нН	Амплитуда последнего отрыва, нН	Работа сил адгезии, Дж, $\times 10^{-15}$	Средняя амплитуда всех отрывов, нН	Число опытов
60	0,694 \pm 0,089	0,536 \pm 0,072	0,42 \pm 0,07	0,589 \pm 0,080	62
30	0,628 \pm 0,063	0,426 \pm 0,045	0,36 \pm 0,07	0,550 \pm 0,059	104
6	0,454 \pm 0,041	0,306 \pm 0,029	0,15 \pm 0,03	0,397 \pm 0,042	101

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

Уменьшение скорости нагружения межмолекулярной связи приводит к снижению регистрируемой силы разрыва связи и работы сил адгезии. Предположительно, снижение определяемых силовых характеристик может быть связано с увеличением времени, затраченного на разрушение образовавшейся межмолекулярной связи. Как считается, у молекул есть 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).

Таким образом, данные силовой спектроскопии, полученные на модельных системах “ЛПС - МКАт” и “мышинные антитела - антимышинные антитела”, подтверждают корректность методики функционализации кантилевера препаратом липополисахарида, а также демонстрируют эффективность выбранных критериев оценки силы межмолекулярных взаимодействий.

3.2. Оценка силовых характеристик в модельной системе «молекула - клетка»

Для оценки силовых характеристик в системе “антиген - клетка” в качестве объекта исследования использовались кантилеверы из нитрида кремния, функционализированные препаратами ЛПС-EV, ЛПС-10, OmpF, OmpC, Ail, Psa,

БСА. Подробное описание сенситинов приводится в п. 2.2 «Использованные сенситины». Вторым объектом во взаимодействующей системе являлись мышинные макрофаги J774, фиксированные на поверхности слюды с использованием глутарового альдегида.

3.2.1. Обоснование выбора клеточной культуры

Макрофаги играют важную роль в иммуногенезе и патогенезе инфекционных заболеваний. Они выполняют защитную функцию в организме, заключающуюся в способности осуществлять фагоцитоз паразитов и микробов (Elhelu, 1983). Также известно, что макрофаги выполняют антигенпрезентирующую функцию (Miyazaki et al., 1993). Вероятность возникновения и силы иммунного ответа с участием макрофагов зависит от эффективности связывания антигена с поверхностными рецепторами клетки.

Использованная в исследованиях культура клеток мышинных макрофагов J774 является подходящим объектом для изучения силовых характеристик взаимодействия бактериальных антигенов с клеточными рецепторами. Клетки данной линии имеют на своей поверхности рецепторы CD14, TLR4 и MD-2, взаимодействующие, в частности, с липополисахаридом грамотрицательных бактерий. При типичном взаимодействии ЛПС с поверхностью клетки происходит связывание его с рецептором CD14, который затем переносит молекулу антигена к комплексу TLR4/MD-2 (Park et al., 2009). Активация макрофагов путём связывания липополисахарида с комплексом TLR4/MD-2 запускает два провоспалительных сигнальных пути: один из них зависит от внутриклеточного адаптерного белка MyD88 на плазматической мембране, а другой - от белка TRIF в эндосомах (Czerkies et al., 2013).

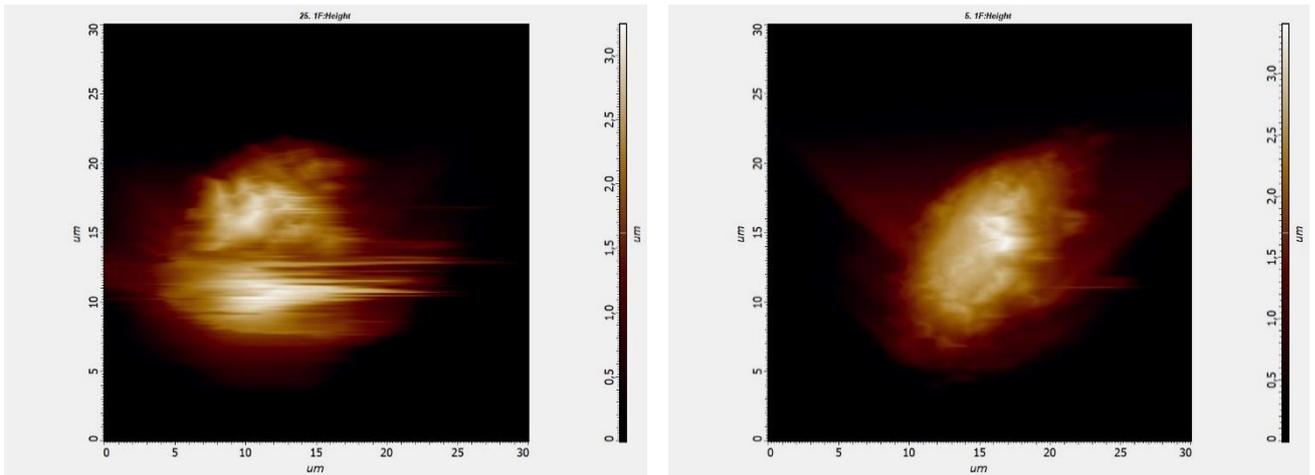
Поскольку макрофаги являются одним из основных компонентов защитной системы макроорганизма от патогенов, а также несут на своей поверхности специфические рецепторы для взаимодействия с бактериальными антигенами, они являются одним из основных объектов для изучения физиологических аспектов функционирования иммунной системы на клеточном уровне, в том числе с

использованием методов силовой спектроскопии. Так, ранее методом оптической ловушки было установлено влияние О-боковых цепей на адгезию ЛПС к макрофагам J774 (Бывалов и др., 2018), а также оценены силовые характеристики взаимодействия ряда поверхностных антигенов иерсиний с клеточной поверхностью макрофагов этой линии (Коньшев и др., 2022).

3.2.2. Выбор клетки для измерений методом силовой спектроскопии

Макрофаги линии J774, иммобилизованные на твёрдой подложке, характеризуются большим варьированием формы клетки, однако в подавляющем большинстве имеют вытянутую или шарообразную форму. Перед определением силовых характеристик межмолекулярного взаимодействия необходимым шагом является выбор клетки для проведения соответствующих измерений путем сканирования её поверхности в целях определения участка, на котором будет производиться оценка взаимодействия.

Пригодность клетки вначале оценивали визуально с помощью оптической надстройки АСМ - определялось наличие колебаний клетки в среде при механическом перемещении сканера. Данные колебания указывают на то, что клетки могут открепиться от поверхности подложки во время сканирования и прилипнуть к зонду. Такие клетки в дальнейшей работе не использовали. Клетки, которые были прочно прикреплены к поверхности стекла, подвергались сканированию. Иногда сложно визуально оценить прочность прикрепления клетки к субстрату, в таком случае её непригодность может выясниться при приложении силы со стороны кантилевера на этапе сканирования. На рисунке 12 приведён пример сканов клеточной поверхности макрофагов J774. Для плохо прикреплённой клетки на таком изображении наблюдаются артефакты (А), в то время как для клетки, пригодной для силовой спектроскопии, они отсутствуют, а границы такой клетки являются ровными и ясно различимыми (Б).



А

Б

Рисунок 12 – Сканы поверхности клеток J774, полученные методом атомно-силовой микроскопии: (А) плохо прикрепившаяся клетка и (Б) клетка, пригодная для силовой спектроскопии. Размеры сканов 30x30 мкм

3.2.3. Отработка условий фиксации клеток глутаровым альдегидом

В отличие от проведения силовой спектроскопии для системы взаимодействующих молекул, изучение адгезивных свойств живых объектов осложнено несколькими факторами: время работы с живыми клетками ограничено временем их жизни в измерительной ячейке атомно-силового микроскопа (около 40-60 минут); наличие филоподий может затруднять регистрацию взаимодействий между зондом и поверхностью клетки; большая неоднородность поверхности живых клеток по высоте осложняет процесс сканирования; вязкоупругие свойства клеток затрудняют идентификацию момента контакта иглы кантилевера с поверхностью. Некоторые из этих проблем могут быть решены путём фиксации клеток на поверхности подложки.

В экспериментах по определению условий иммобилизации макрофагов J774 на поверхности стекла для проведения силовой спектроскопии производили их обработку раствором глутарового альдегида, варьируя его концентрацией и временем инкубации. Клетки инкубировали в ФБР, содержащем ГА в концентрациях 0,03; 0,05; 0,1 и 2 %, в течение 30 минут. Инкубацию клеток в 0,1 %-ном растворе ГА производили также при 5 и 15-минутной выдержке. Оценку силы

взаимодействия между ЛПС-EV и клетками проводили при скорости нагружения межмолекулярной связи, равной 480 нН/с. Концентрация ЛПС-EV, использованного при функционализации зонда, - 100 мкг/мл.

Изучение морфологических особенностей поверхности макрофагов J774 методом атомно-силовой микроскопии в жидкости показало, что при увеличении концентрации глутарового альдегида, а также при увеличении времени фиксации поверхность клеток приобретает выраженный рельеф, а сами клетки становятся более жесткими (рисунок 13). Как было отмечено ранее, проведение силовой спектроскопии в системе “ЛПС - живые клетки” осложнено наличием на поверхности макрофагов филоподий, длина которых может достигать нескольких десятков микрометров. Использование глутарового альдегида позволяет существенно уменьшить влияние филоподий на определяемые силовые характеристики. Длина ассоциата, характеризующая протяженность поверхностных структур макрофага, в частности филоподий, и реологические свойства клетки, в среднем, уменьшилась после обработки их глутаровым альдегидом с 10 мкм до 450 нм.

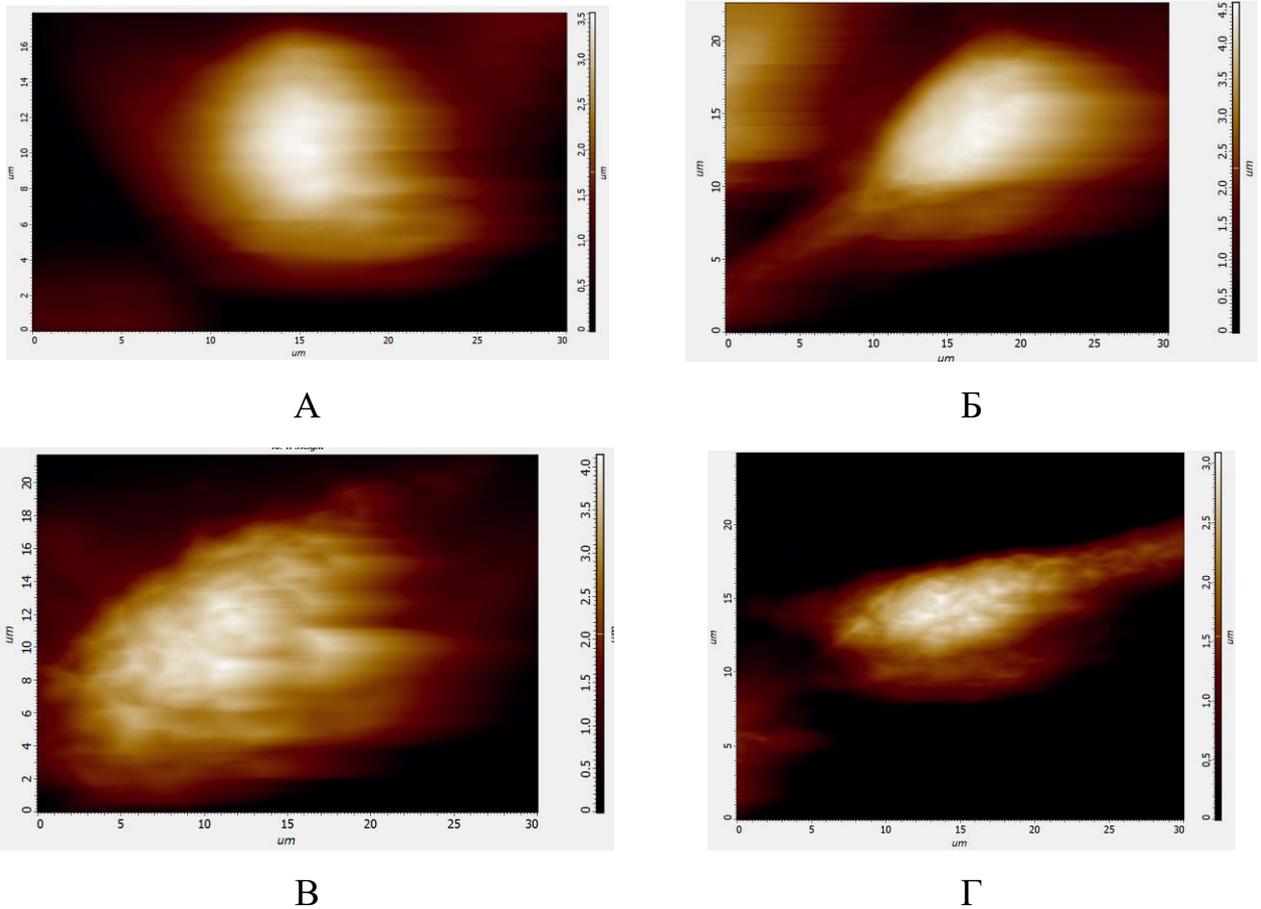


Рисунок 13 – Сканы поверхности клеток J774, полученные методом атомно-силовой микроскопии: (А) – живая клетка (размер скана – 30x18 мкм); (Б) клетка, фиксированная в течение 5 минут (размер скана – 30x23 мкм); (В) клетка, фиксированная в течение 15 минут (размер скана – 30x22 мкм); (Г) клетка, фиксированная в течение 30 минут (размер скана – 30x25 мкм). Концентрация ГА во всех случаях составляла 0,1 % (Белозёров и др., 2021).

Результаты оценки влияния концентрации глутарового альдегида на адгезивность ЛПС-EV к макрофагам J774 с использованием атомно-силовой микроскопии представлены в таблице 9. Увеличение концентрации глутарового альдегида при фиксации макрофагов с 0,05 до 2 % приводит к существенному ($p > 0,99$) снижению работы сил адгезии. Предположительно, это снижение связано с уменьшением количества неспецифических связей, образующихся с клеткой, в частности, с филоподиями. Следует отметить, что при увеличении концентрации альдегида наблюдается достоверное ($p > 0,99$) уменьшение длины ассоциата, что

может указывать на снижение влияния со стороны филоподий и увеличение упругости клеток. Также наблюдается существенное ($p > 0,95$) уменьшение силы последнего разрыва и средней амплитуды всех разрывов при увеличении концентрации глутарового альдегида с 0,1 до 2 %. Можно предположить, что фиксация клеток ГА в высокой концентрации может приводить к снижению реакционной способности или экранированию поверхностных рецепторов, что отражается в снижении регистрируемых силовых характеристик.

Считается, что применение глутарового альдегида способствует стабилизации рецепторов на клеточной мембране (Targosz et al., 2006). Однако, как видно из представленных данных, чем меньше использованная концентрация фиксирующего агента, тем ближе форма клетки и, предположительно, свойства её поверхности к таковым для нативных клеток, не прошедших процесс иммобилизации. Наиболее приемлемой концентрацией ГА для фиксации клеток, по-видимому, следует считать 0,1 %, так как увеличение концентрации до 2 % приводит к снижению регистрируемых сил и к уменьшению количества образующихся связей, что может быть признаком снижения нативности поверхностных рецепторов, а концентраций 0,03 и 0,05 % может быть недостаточно, чтобы снизить влияние филоподий на определяемые силовые характеристики. Далее при данной концентрации глутарового альдегида (0,01 %) определялось влияние времени инкубации на регистрируемую силу взаимодействия.

Таблица 9 – Зависимость силовых характеристик в системе “ЛПС-EV – клетки J774” от концентрации глутарового альдегида ($X_{mean} \pm I_{99}$)

Концентрация глутарового альдегида, %	Сила первого отрыва, нН	Сила последнего отрыва, нН	Средняя сила всех отрывов, нН	Работа сил адгезии, Дж, $\times 10^{-15}$	Длина ассоциата, нм	Среднее количество отрывов	Общее количество силовых кривых
0,03	9,309 \pm 2,578	23,568 \pm 4,141	28,204 \pm 1,996	53,42 \pm 15,01	426,8 \pm 50,1	4,89 \pm 0,48	391
0,05	9,960 \pm 2,932	26,772 \pm 5,144	32,688 \pm 2,870	80,26 \pm 26,15	399,6 \pm 57,9	3,60 \pm 0,43	273
0,1	4,669 \pm 2,445	27,016 \pm 4,817	33,057 \pm 2,542	50,45 \pm 15,30	238,6 \pm 43,7	4,15 \pm 0,47	402
2	5,631 \pm 3,742	19,614 \pm 5,808	22,725 \pm 3,792	28,70 \pm 12,41	204,5 \pm 59,7	3,50 \pm 0,45	184

Примечание: 1. Время инкубации клеток в растворе ГА - 30 мин.,

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

Оценка влияния времени фиксации клеток на определяемые силовые характеристики производилась с использованием макрофагов J774, обработанных 0,1 % глутаровым альдегидом в течение 5, 15 и 30 минут. В таблице 10 приведены данные силовой спектроскопии, характеризующие влияние указанного параметра на силовые характеристики межмолекулярного взаимодействия ЛПС-EV – поверхность клеток J774.

Как видно из приведённых данных (таблица 10), увеличение времени фиксации клеток глутаровым альдегидом, в среднем, приводит к существенному ($p > 0,99$) повышению силы разрыва последней связи, средней силы всех разрывов и работы сил адгезии. Вместе с этим наблюдается снижение длины ассоциата при увеличении времени обработки клеток до 30 минут, что может указывать на увеличение упругости клеток и снижение влияния поверхностных структур на оцениваемый параметр. Кроме того, увеличение времени фиксации свыше 5 минут приводит к увеличению количества образующихся связей между ЛПС и поверхностью клетки. Предположительно, данные связи могут иметь как специфическую, так и неспецифическую (взаимодействие ЛПС со свободными альдегидными группами ГА, присоединенного к поверхности клеток после фиксации) природу.

Таблица 10 – Зависимость силовых характеристик в системе “ЛПС-EV – клетки J774” от времени фиксации 0,1 %-ным глутаровым альдегидом ($\bar{X}_{mean} \pm I_{99}$)

Время фиксации глутаровым альдегидом	Сила первого отрыва, нН	Сила последнего отрыва, нН	Средняя сила всех отрывов, нН	Работа сил адгезии, Дж, $\times 10^{-15}$	Длина ассоциата, нм	Среднее количество отрывов	Общее количество силовых кривых
5 мин	5,184±0,663	6,352±1,289	7,932±1,051	8,18±3,02	343,0±44,8	2,01±0,18	368
15 мин	5,760±2,304	18,351±3,947	25,733±2,559	43,77±22,14	407,7±63,6	3,86±0,59	256
30 мин	4,669±2,445	27,016±4,817	33,057±2,542	50,45±15,30	238,6±43,7	4,15±0,47	402

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

Таким образом, глутаровый альдегид влияет не только на морфологические особенности клеток, но и, возможно, на реакционную способность структур, находящихся на поверхности клетки. Для дальнейших экспериментов по силовой спектроскопии были выбраны следующие условия их иммобилизации: 30-минутная обработка в 0,1 %-ном растворе глутарового альдегида.

3.2.4. Роль поверхностных антигенов иерсиний в их адгезии к макрофагам J774

Важным этапом изучения межклеточной адгезии, происходящей при взаимодействии бактериальной и эукариотической клеток, является оценка вклада отдельных поверхностных антигенов бактерии в указанное взаимодействие. В качестве антигенов, иммобилизованных на поверхности зонда, в данном исследовании использовались препараты липополисахарида ЛПС-EV и ЛПС-10, порины OmpF и OmpC, а также белки Ail и Psa. Для этих антигенов ранее тем или иным способом была показана их способность адгезировать к эукариотическим клеткам. Отрицательным контролем являлся АСМ-зонд, покрытый препаратом БСА. Концентрация вышеуказанных сенситинов, использованных для функционализации кантилевера, была равной 100 мкг/мл.

Оценка силовых характеристик межмолекулярного взаимодействия между бактериальными антигенами и клеточной поверхностью макрофагов J774 производилась при следующих условиях: скорость нагружения межмолекулярной связи - 60 нН/с; время контакта сенсibilизированного зонда с клеточной поверхностью - 1 секунда; иммобилизация клеток J774 производилась с использованием 0,1 % раствора ГА в течение 30 минут; все измерения проводились в ФБР при комнатной температуре.

В ходе проведения силовой спектроскопии клеток J774 были получены значения силы взаимодействия, превышающие несколько наноньютонов. В работах (Florin et al., 1994; Lee et al., 2007; Novotny et al., 2019; Grandbois et al., 1999) показано, что силы в несколько наноньютонов может быть достаточно для того, чтобы разорвать ковалентные связи. Так, чтобы разрушить ковалентную связь углерод-

углерод или кремний-углерод нужно приложить силу равную 1,6 и 2,0 нН, соответственно, а для разрыва нековалентных связей, например, между биотином и стрептавидином достаточно силы в несколько сотен пиконьютон.

В этой связи для обработки экспериментальных данных было принято решение использовать фильтрацию (удаление) высокоамплитудных отрывов. Если на силовой кривой регистрировался хотя бы один разрыв связи, превышающий значение силы 1 нН, то такая силовая кривая не учитывалась при расчёте силовых характеристик взаимодействия. В таблице 11 приведены отфильтрованные по указанному выше критерию данные для всех сенситинов.

Таблица 11 – Силовые характеристики взаимодействия бактериальных антигенов с поверхностью клеток J774 (фильтрация данных - 1нН) ($X_{\text{mean}} \pm I_{99}$)

Антиген	Сила последнего отрыва, нН	Работа сил адгезии, Дж $\times 10^{-15}$	Средняя сила всех отрывов, нН	Сила первого отрыва, нН	Длина ассоциата, нм	Среднее 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 ($p=0,99$).

Анализ результатов, полученных с применением фильтрации (таблица 11), показывает, что порины OmpF и OmpC могут связываться с клетками приблизительно с той же силой, что и препараты липополисахарида. 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 имеет более выраженное взаимодействие с клеточной поверхностью, чем ЛПС-10, по критерию работа сил адгезии ($p > 0,99$). Различий между поринами OmpF и OmpC установлено не было.

Для белков Ail и Psa были зарегистрированы существенно меньшие значения силы взаимодействия ($p > 0,99$) в сравнении с другими препаратами по показателям силы отрывов (последнего, первого и всех отрывов). Однако, 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 11). Вместе с тем, вероятность взаимодействия (количество отведений с отрывами, таблица 11) 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. Эти внешне противоречивые данные могут объясняться различиями в механизмах связывания с поверхностью макрофагов этих антигенов, химический состав которых различен. Так, клетки *Y. pestis*, как известно, используя коровую область липополисахарида, способны адгезировать к антигенпрезентирующим клеткам (мышинным макрофагам J774A.1) посредством связывания с рецептором CD209b (Yang et al., 2019), а также клеткам Лангерганса человека через рецептор CD207 (Yang et al., 2015). До настоящего времени нет убедительных данных, которые бы свидетельствовали о способности чумного микроба взаимодействовать с рецепторами TLR4, CD14 иммунокомпетентных клеток посредством липида А липополисахарида, связанного или несвязанного с микробной клеткой. Последнее показано для липида А *E. coli* (Huber et al., 2006).

Вместе с тем, есть основания полагать, что вышеназванные рецепторы являются не единственными структурами клеточной стенки макрофага, с которыми может связываться ЛПС иерсиний. На это указывают результаты определения методом оптической ловушки адгезивности препаратов ЛПС-EV и ЛПС-10, первый из которых не включает О-боковые цепи, второй содержит поверхностно расположенные длинные О-боковые цепи (Бывалов и др., 2017), которые, как считается, экранируют глубже расположенные структуры наружной мембраны, в том числе коровый участок ЛПС (Lu et al., 2011). Однако, как оказалось, препарат ЛПС-10 проявляет достоверно более высокую адгезивность к иммобилизованным макрофагам J774 по сравнению с ЛПС-EV. Учитывая близость химического состава липида А и кора липополисахарида *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, полученные результаты следует объяснять наличием О-антигена в составе ЛПС-10. Вместе с тем, авторам не удалось выявить на поверхности макрофагов структур, ответственных за указанный эффект (Бывалов и др., 2017). Белок рН 6 может связываться с галактозильными остатками гликофинголипидов и фосфатидилхолина на поверхности альвеолярных эпителиальных клеток (Felek et al., 2010). Белок Ail связывается с фибронектином эпителиальных (HEp-2) и моноцитарных (THP-1) клеток человека (Tsang et al., 2010). Методом оптической ловушки выявлена адгезивность порина OmpF *Y. pseudotuberculosis* в отношении клеток J774 (Бывалов и др., 2018), однако структура на поверхности клетки, с которой взаимодействует этот порин, не была идентифицирована. Вышеприведенные данные литературы свидетельствуют о сложности и разнообразии механизмов взаимодействия поверхностных антигенов иерсиний с эукариотическими клетками. Сам факт установления адгезивности того или иного антигена и степень ее выраженности определяются выбранными методами исследования, условиями их проведения. Как показывают данные литературы, результаты соответствующих исследований далеко не всегда совпадают для каждого отдельно взятого антигена и/или типа использованных эукариотических клеток. Тем более результаты подобных экспериментов могут не отражать реальной картины взаимодействия патогена и организма хозяина в условиях *in vivo*.

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

Показано, что рецептор TLR4 экспрессируется многими иммунокомпетентными клетками – моноцитами, дендритными клетками, макрофагами и, кроме того, неиммунными, в частности, эндотелиальными клетками (Vaure, Liu, 2014). Рецептор CD14 продуцируется клетками миелоидного происхождения также нескольких типов (Mahnke et al., 1997; Sabroe et al., 2002). Как было указано в п. 3.2.1, макрофаги линии J774 несут на своей поверхности рецепторы TLR4 и CD14. Наличие на поверхности макрофагов этих рецепторов подтверждали методом флуоресцентной и конфокальной микроскопии интактных клеток, а также клеток после их обработки конъюгатом на основе моноклональных антител к тому или иному рецептору. Отрицательным контролем служили клетки KB, которые, по данным литературы, не должны экспрессировать указанные рецепторы.

Как показали результаты флуоресцентной микроскопии (рисунок 14), клетки J774, в отличие от клеток KB, характеризуются выраженной экспрессией на своей поверхности рецепторов TLR4 и CD14. Результаты флуоресцентной микроскопии были подтверждены при изучении образцов методом конфокальной микроскопии. Как видно на рисунке 15, при окрашивании клеток двух использованных в работе линий конъюгатом FITC с моноклональными антителами к рецептору CD14 существенной экспрессией этих рецепторов характеризовались клетки J774, но не KB.

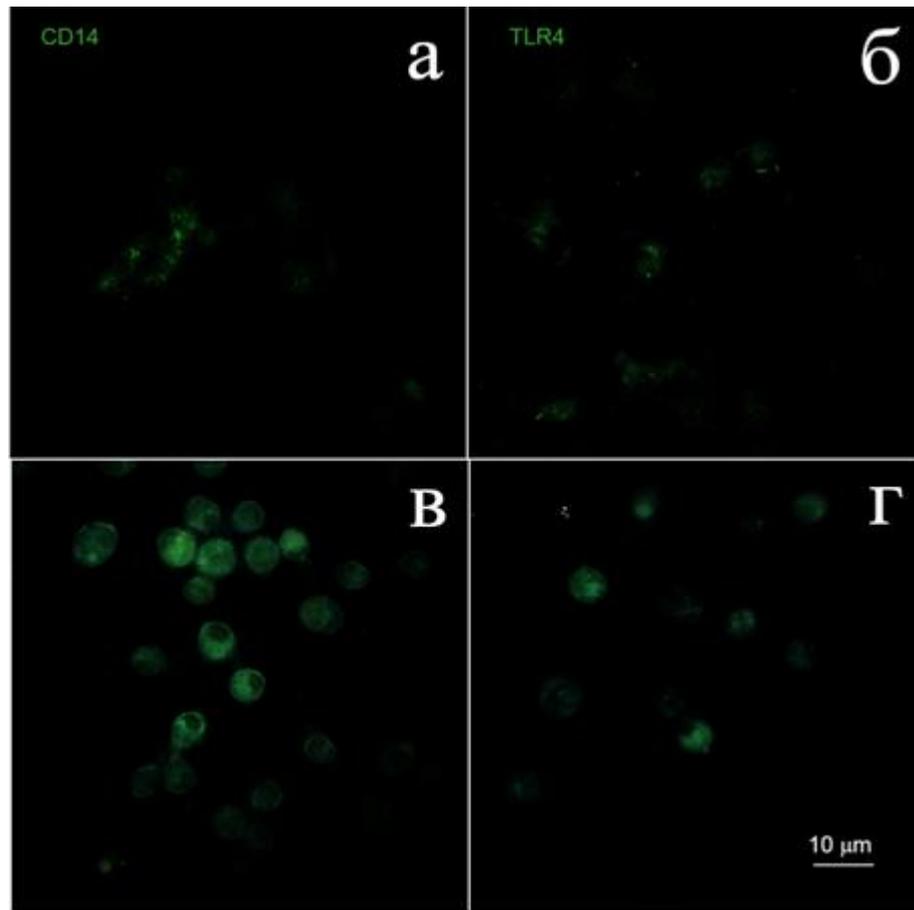


Рисунок 14 – Визуализация клеток KB (а, б) и J774 (в, г), обработанных моноклональными антителами к CD14 (а, в) и TLR4 (б, г), с помощью флуоресцентной микроскопии.

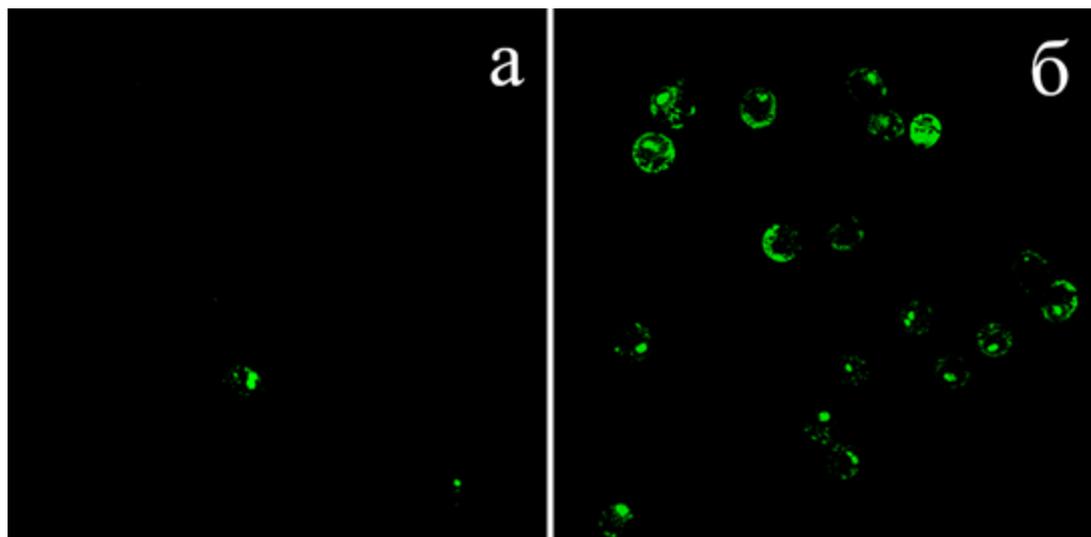


Рисунок 15 – Визуализация клеток KB (а) и J774 (б), обработанных моноклональными антителами к CD14, с помощью конфокальной микроскопии.

Для оценки возможного вклада рецепторов CD14 и TLR4 в оцениваемую силу взаимодействия между ЛПС и клеточной поверхностью проводили блокировку рецепторов комплементарными моноклональными антителами. Оценку силовых характеристик взаимодействия проводили с использованием кантилевера, сенсibilизированного препаратом ЛПС-EV, и клетками J774, интактными, а также обработанными коммерческими препаратами мышинных моноклональных антител к рецепторам CD14 и TLR4. Дополнительным контролем являлись эксперименты с обработкой клеток препаратом ЛПС-EV.

Условия фиксации клеток и проведения силовой спектроскопии были аналогичны тем, что использовались при изучении роли поверхностных антигенов иерсиний в их адгезии к макрофагам J774 (п. 3.2.4). Для сенсibilизации кантилевера использовался препарат ЛПС-EV в концентрации 350 мкг/мл. Блокировка клеточных рецепторов TLR4 и CD14 на поверхности макрофагов J774 осуществлялась путём добавления к клеткам моноклональных антител anti-TLR4 и/или anti-CD14 в концентрации 1 мкг/мл, либо путём инкубации клеток с препаратом ЛПС-EV в концентрации 100 мкг/мл, предварительно отцентрифугированным (13000g, 15 мин) и микрофильтрованным через насадку Millipore (размер пор - 0,22 мкм) непосредственно перед внесением в чашку с покровными стёклами, на которых располагались клетки.

Как известно, сила межмолекулярных связей в системах «антиген – антитело», оцениваемая биофизическими методами, не превышает несколько сотен пиконьютон (Arnal et al., 2015). В ходе проведения экспериментов нами были зарегистрированы в том числе и значения силы взаимодействия, превышающие несколько наноньютон. Это, очевидно, объясняется множественностью формируемых связей между поверхностью клетки и липополисахаридом, иммобилизованном на зонде. Как известно, препараты ЛПС в растворе представляют собой смесь структур различной молекулярной массы – от субъединиц этого антигена до крупномолекулярных агрегатов. Форма и размер последних зависят как от концентрации и свойств препарата ЛПС, так и от параметров среды, таких как pH, температура, наличие катионов и др. (Santos et al.,

2003; Richter et al., 2010; Bergstrand et al., 2006). Даже центрифугирование и микрофильтрация препарата ЛПС, проведенные непосредственно перед процедурой сенсibilизации кантилевера, не предотвращают наличия в растворе относительно крупномолекулярных агломератов ЛПС. Регистрация высокоамплитудных отрывов определяется также и эластичностью клеточной стенки. Вышеназванные причины обуславливают формирование выраженной площади контакта между взаимодействующими объектами, вызывающее появление многочисленных специфических и неспецифических связей, которые и объясняют регистрацию значительных сил отрывов. К числу неспецифических компонентов исследуемого взаимодействия можно отнести силы, прилагаемые для «расплетания» крупномолекулярных агломератов ЛПС. Неспецифическое связывание может определяться также вполне вероятным гидрофобным взаимодействием ЛПС с неидентифицированными гидрофобными структурами поверхности макрофага, а также электростатическим взаимодействием ЛПС с положительно заряженными участками клеточной мембраны или внеклеточного матрикса. Кроме того, возможное наличие незаблокированных аминных групп АРТЕS на зонде и альдегидных групп глутарового альдегида на поверхности макрофага может вносить значительный вклад в регистрируемые силы связи. В целях минимизации выявления неспецифических связей и, предположительно, множественных специфических связей ЛПС с рецепторами макрофага была проведена фильтрация сил отрыва путем выбраковки силовых кривых, содержащих отрывы, превышающие 1 нН. Именно эти данные представлены в таблице 12.

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 блокированными 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. Представленные в таблице 12 данные указывают на то, что взаимодействие ЛПС *Y. pestis* с рецептором CD14 может происходить и без участия липополисахаридсвязывающего белка. Вполне вероятно также, что водорастворимый ЛПС может связываться с рецептором CD209b макрофагов линии J774 и рецептором CD207 клеток Лангерганса, препятствуя взаимодействию с ними ЛПС, иммобилизованного на зонде, что, в целом, приводит к снижению силовых характеристик. Такое предположение согласуется с данными Yang K. et al., показавших, что чумной микроб за счет коровой области ЛПС может связываться с этими рецепторами антигенпрезентирующих клеток (Yang et al., 2019; Yang et al., 2015). Также следует 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 12).

Таблица 12 – Силовые характеристики взаимодействия ЛПС-EV с поверхностью клеток J774 (фильтрация данных - 1нН)
($X_{mean} \pm I_{99}$)

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

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведённой работы были разработаны и эмпирически обоснованы методические подходы для изучения механизмов межмолекулярного взаимодействия бактериальных антигенов с поверхностью эукариотической клетки, основанные на использовании атомно-силовой микроскопии. Данные методические подходы могут применяться при изучении физиологических и биофизических аспектов процесса первичной адгезии патогена к тканям хозяина на клеточном, субклеточном и молекулярном уровнях.

На предварительном этапе исследования использовались две модельные системы взаимодействующих молекул: “ЛПС - моноклональные антитела” и “мышинные антитела - антимышинные антитела”, различающиеся по размерам и конформационным свойствам одного из компонентов систем. На указанных моделях были определены и апробированы основные критерии оценки силы взаимодействия: амплитуда первого отрыва; амплитуда последнего отрыва; дистанция, на которой произошёл последний отрыв от момента контакта слюды и кантилевера; работа, которую необходимо совершить для разрыва всех образовавшихся связей; длина ассоциата; средняя амплитуда всех отрывов; максимальная адгезия; среднее количество отрывов на один график; количество графиков, имеющих как минимум один разрыв связи. Была показана эффективность применения выбранных силовых характеристик для количественной оценки взаимодействия ЛПС-10 *Y. pseudotuberculosis* со специфическими (МКАт2) и неспецифическими (МКАт7) антителами. Так, сила разрыва последней связи, которая, как считается, должна отражать специфическое взаимодействие (Krasnoslobodtsev et al., 2007; Roes et al., 2006; Targosz et al., 2006), для взаимодействия ЛПС с МКАт2 и МКАт7 составила $2,267 \pm 0,211$ и $1,169 \pm 0,134$ нН, соответственно, при скорости нагружения межмолекулярной связи 30 нН/с и времени контакта 1 секунда. Был установлен значительный вклад неспецифической

компоненты в оцениваемые силовые характеристики. Неспецифическое связывание может быть вызвано расплетанием полимерных молекул ЛПС, а также связыванием липополисахарида со свободными аминными и альдегидными группами на модифицированной слюде.

В качестве простой модели, исключая влияние полимерных молекул на механизм и силу изучаемой связи, использовалась система “мышинные антитела - антимышинные антитела”, в которой последние были применены вместо ЛПС, включающего высокомолекулярные структуры. На наличие протяжённых молекул ЛПС, иммобилизованных на поверхности зонда, указывает, в частности, такой параметр, как длина ассоциата. Значение этого параметра, например, для взаимодействия между ЛПС-кантилевером и аминными группами АРТЕS на слюде составило $103,7 \pm 34,5$ нм, а для пары “антимышинные антитела - АРТЕS” - $19,7 \pm 9,8$ нм. При этом длина ассоциата при взаимодействии АРТЕS-слюды с чистым кантилевером составила $13,2 \pm 9,8$ нм. На модельной системе «мышинные антитела – антимышинные антитела» было установлено, что увеличение скорости нагружения межмолекулярной связи и времени контакта молекул приводит к повышению значений силовых характеристик взаимодействия. Вышеприведенные экспериментальные данные позволили определить условия проведения силовой спектроскопии и основные критерии оценки силы взаимодействия для комплексной системы “бактериальный антиген - макрофаг J774”.

В ходе предварительных исследований была отработана методика иммобилизации макрофагов на стекле с помощью глутарового альдегида, позволяющая проводить силовую спектроскопию исследуемых взаимодействий. Как показали результаты проведенных исследований, выраженность взаимодействия ЛПС-10, поринов OmpF и OmpC *Y. pseudotuberculosis*, а также ЛПС-EV *Y. pestis* с поверхностью клеток, оцененная по таким показателям, как сила первого, последнего отрывов и средняя сила отрывов, приблизительно одинакова и лишь незначительно превышала таковую для БСА. В ранее проведенных исследованиях с использованием иных методических подходов было показано, что все четыре названных антигена в той или иной мере являются адгезинами иерсиний

в отношении макрофагов J774 (Бывалов и др., 2017; Бывалов и др., 2018). Учитывая, что в этих работах в качестве препаратов сравнения также применялся БСА, можно предположить, что взаимодействие ЛПС и поринов с поверхностью макрофагов J774, оцениваемое методом АСМ в использованных условиях, определяется в значительно большей степени неспецифическими силами. Данные, полученные для адгезинов Ail и Psa, показывают, что значения трех вышеназванных показателей оказались существенно ниже по сравнению с препаратами ЛПС и поринов, это свидетельствует о меньшем вкладе неспецифической составляющей во взаимодействие сенсibilизированного антигенами зонда с клеточной поверхностью. Вместе с тем, более высокие, чем для препаратов ЛПС и поринов, значения таких показателей, как доля отведений с отрывами и среднее количество отрывов при отведении указывают на наличие специфической связи антигенов Ail и Psa с телом макрофагов или внеклеточным матриксом.

Определены силовые характеристики взаимодействия липополисахарида *Yersinia pestis* EV на поверхности зонда с иммобилизованными макрофагами линии J774, поверхность которых была обработана специфическими моноклональными антителами к рецепторам TLR4 и CD14 или препаратом ЛПС-EV. Блокировка рецептора TLR4 привела к значительному ($p > 0,99$) снижению основных силовых характеристик взаимодействия, использованных в эксперименте. Аналогичные, но несколько менее выраженные изменения были зарегистрированы при блокировке рецептора CD14 комплементарными моноклональными антителами. Коинкубация макрофагов J774 с препаратом ЛПС, выделенным из клеток вакцинного штамма EV *Y. pestis*, также вызывала снижение основных характеристик взаимодействия ЛПС-зонда с поверхностью макрофагов. С учетом имеющихся данных литературы о способности ЛПС некоторых грамотрицательных бактерий связываться с рецепторами TLR4 и CD14, можно предположить, что указанное снижение применительно к ЛПС *Y. pestis* объясняется взаимодействием ЛПС с этими рецепторами, препятствующим их связыванию с ЛПС-зондом.

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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АСМ	атомно-силовая микроскопия
БСА	бычий сывороточный альбумин
ГА	глутаровый альдегид
ЛПС	липополисахарид
МКАт	моноклональные антитела
ПЭГ	полиэтиленгликоль
СЭМ	сканирующая электронная микроскопия
ТИФА	твёрдофазный иммуноферментный анализ
ТЭМ	трансмиссионная электронная микроскопия
ФБР	фосфатный буферный раствор
ЭПС	экзопполисахарид
APTES	(3-Аминопропил)триэтоксисилан
CD	кластер дифференцировки
DFL	сигнал фотодетектора
EDC	1-Этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид
MD	миелоидный фактор дифференцировки
NHS	N-гидроксисукцинимид
TLR	толл-подобный рецептор

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бахтеева, И.В. Взаимодействие рН 6 антигена *Yersinia pestis* с различными типами эукариотических клеток / И.В. Бахтеева, Т.Б. Кравченко, Г.М. Титарева, С.А. Иванов // Проблемы особо опасных инфекций. – 2007. – Т. 94. – С. 40–44.
2. 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.
3. 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.
4. Бывалов, А.А. Адгезивность поринов OmpF и OmpC *Yersinia pseudotuberculosis* к макрофагам J774 / А.А. Бывалов, И.В. Коньшев, О.Д. Новикова, О.Ю. Портнягина, В.С. Белозеров, В.А. Хоменко, В.Н. Давыдова // Биофизика. – 2018. – Т. 63. – № 5. – С. 913–922.
5. Бывалов, А.А. Адгезины *Yersinia pseudotuberculosis* / А.А. Бывалов, И.В. Коньшев // Инфекция и иммунитет. – 2019. – Т. 9. – № 3–4. – С. 437–448.
6. Бывалов, А.А. Влияние О-боковых цепей липополисахарида на адгезивность *Yersinia pseudotuberculosis* к макрофагам J774, установленное методом оптической ловушки / А.А. Бывалов, В.Л. Кононенко, И.В. Коньшев // Прикладная биохимия и микробиология. – 2017. – Т. 53. – № 2. – С. 234–243.
7. Бывалов, А.А. Исследование взаимодействия липополисахаридов *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia pestis* с мембраной макрофага J774 методом силовой

спектроскопии с использованием оптического пинцета / А.А. Бывалов, В.Л. Кононенко, И.В. Коньшев // Биологические мембраны. – 2018. – Т. 35. – № 2. – С. 115–130.

8. Коньшев, И.В. Роль антигенов *Yersinia pestis* в адгезии к макрофагам J774, оцененная методом оптической ловушки / И.В. Коньшев, С.А. Иванов, П.Х. Копылов, А.П. Анисимов, С.В. Дентовская, А.А. Бывалов // Прикладная биохимия и микробиология – 2022. – Т. 58. – № 4. – С. 352–359.

9. Новикова, О.Д. Влияние способа экстракции порообразующего белка из *Yersinia pseudotuberculosis* на его макромолекулярную организацию / О.Д. Новикова, Л.И. Федореева, В.А. Хоменко, О.Ю. Портнягина, И.М. Ермак, Г.Н. Лихацкая, С.В. Мороз, Т.Ф. Соловьева, Ю.С. Оводов // Биоорг. химия. – 1993. – Т. 19. – № 5. – С. 536–547.

10. Abdel-Glil, M.Y. Phylogenetic Relatedness and Genome Structure of *Yersinia ruckeri* Revealed by Whole Genome Sequencing and a Comparative Analysis / M.Y. Abdel-Glil, U. Fischer, D. Steinhagen, U. McCarthy, H. Neubauer, L.D. Sprague // Front Microbiol. – 2021. – V. 12. – 782415.

11. Aksu, S.B. Calibration of atomic force microscope cantilevers using piezolevers / S.B. Aksu, J.A. Turner // Rev. Sci. Instrum. – 2007. – V. 78. – N 4. – 043704.

12. Arnal, L. Localization of adhesins on the surface of a pathogenic bacterial envelope through atomic force microscopy / L. Arnal, G. Longo, P. Stupar, M.F. Castez, N. Cattelan, R.C. Salvarezza, O.M. Yantorno, S. Kasas, M.E. Vela // Nanoscale – 2015. – V. 7. – N 41. – P. 17563–17572.

13. Avci, R. Comparison of antibody-antigen interactions on collagen measured by conventional immunological techniques and atomic force microscopy / R. Avci, M. Schweitzer, R.D. Boyd, J. Wittmeyer, A. Steele, J. Toporski, I. Beech, F.T. Arce, B. Spangler, K.M. Cole, D.S. McKay // Langmuir. – 2004. – V. 20. – N 25. – P. 11053–11063.

14. Barbee, K.A. Subcellular distribution of shear stress at the surface of flow-aligned and nonaligned endothelial monolayers / K.A. Barbee, T. Mundel, R. Lal, P.F. Davies // Am. J. Physiol. – 1995. – V. 268. – N 4. – P. 1765–1772.

15. Behrens, I. Piezoresistive cantilever as portable micro force calibration standard / I. Behrens, L. Doering, E. Peiner // *J. Micromech. Microeng.* – 2003. – V. 13. – S171.
16. Ben-Efraim, S. New antigenic component of *Pasteurella Pestis* formed under specified conditions of pH and temperture / S. Ben-Efraim, M. Aronson, L. Bichowsky-Slomnicki // *J. Bacteriol.* – 1961. – V. 81. – N 5. – P. 704–714.
17. Bergstrand, A. Aggregation behavior and size of lipopolysaccharide from *Escherichia coli O55:B5* / A. Bergstrand, C. Svanberg, M. Langton, M. Nyden // *Colloids Surf. B Biointerfaces.* – 2006. – V. 53. – N 1. – P. 9–14.
18. Berne, C. Bacterial adhesion at the single-cell level / C. Berne, C.K. Ellison, A. Ducret, Y.V. Brun // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2018. – V. 16. – N 10. – P. 616–627.
19. Binnig, G. Atomic force microscope / G. Binnig, C.F. Quate, C. Gerber // *Phys. Rev. Lett.* – 1986. – V. 56. – N 9. – P. 930–933.
20. Boyle, E.C. Bacterial pathogenesis: exploiting cellular adherence / E.C. Boyle, B.B. Finlay // *Curr. Opin. Cell. Biol.* – 2003. – V. 15. – N 5. – P. 633–639.
21. Brantley, J.N. Mechanobiochemistry: harnessing biomacromolecules for force-responsive materials / Brantley J.N., Bailey C.B., Wiggins K.M., Keatinge-Clay A.T., Bielawski C.W. // *Polym. Chem.* – 2013. – V. 4. – N 12. – P. 3916–3928.
22. Bustamante, C. Scanning force microscopy under aqueous solutions / C. Bustamante, C. Rivetti, D.J. Keller // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 1997. – V. 7. – N 5. – P. 709–716.
23. Butt, H.J. Scan speed limit in atomic force microscopy / H.J. Butt, P. Siedle, K. Seifert, K. Fendler, T. Seeger, E. Bamberg, A. Weisenhorn, K. Goldie, A. Engel // *J. Microsc.* – 1993. – V. 169. – N 1. – P. 75–84.
24. Byvalov, A.A. Immunochemical activity of *Yersinia pseudotuberculosis* B-antigen / A.A. Byvalov, L.G. Dudina, A.V. Chernyad'ev, I.V. Konyshev, S.G. Litvinets, Yu.S. Ovodov // *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.* – 2015. – V. 33. – N 2. – P. 32–38.
25. Byvalov, A.A. Single-cell force spectroscopy of interaction of Lipopolysaccharides from *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* with J774 macrophage membrane using optical tweezers / A.A. Byvalov, V.L. Kononenko, I.V. Konyshev // *Biochem. Moscow Suppl. Ser.* – 2018. – V. 12. – N 2. – P. 93–106.

26. Byvalov, A.A. Study of *Yersinia pseudotuberculosis* surface antigen epitopes using monoclonal antibodies / A.A. Byvalov, L.G. Dudina, S.G. Litvinets, O.D. Novikova, V.A. Khomenko, O.Iu. Portniagina, Iu.S. Ovodov // Prikl. Biokhim. Mikrobiol. – 2014. – V. 50. – N 2. – P. 203–210.
27. Byvalov, A.A. The adhesiveness of the OmpF and OmpC porins from *Yersinia pseudotuberculosis* to J774 macrophages / A.A. Byvalov, I.V. Konyshchikov, O.D. Novikova, O.Yu. Portnyagina, V.S. Belozеров, V.A. Khomenko, V.N. Davydova // Biophysics. – 2018. – V. 63. – N 5. – P. 727–734.
28. Camesano, T.A. Measuring bacterial adhesion at environmental interfaces with single-cell and single-molecule techniques / T.A. Camesano, Y.T. Liu, M. Datta // Adv. Water Resour. – 2007. – V. 30. – N 6-7. – P. 1470–1491.
29. Carrion-Vazquez, M. Atomic force microscopy captures length phenotypes in single proteins / M. Carrion-Vazquez, P.E. Marszalek, A.F. Oberhauser, J.M. Fernandez // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 1999. – V. 96. – N 20. – P. 11288–11292.
30. Carrion-Vazquez, M. Mechanical and chemical unfolding of a single protein: a comparison / M. Carrion-Vazquez, A.F. Oberhauser, S.B. Fowler, P.E. Marszalek, S.E. Broedel, J. Clarke, J.M. Fernandez // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 1999. – V. 96. – N 7. – P. 3694–3699.
31. Chauhan, N. *Yersinia* adhesins: an arsenal for infection / N. Chauhan, A. Wrobel, M. Skurnik, J.C. Leo // Proteomics Clin. Appl. – 2016. – V. 10. – N 9–10. – P. 949–963.
32. Cleveland, J.P. A nondestructive method for determining the spring constant of cantilevers for scanning force microscopy / J.P. Cleveland, S. Manne, D. Bocek, P.K. Hansma // Rev. Sci. Instrum. – 1993. – V. 64. – N 2. – P. 403–405.
33. Cluzel, P. DNA: an extensible molecule / P. Cluzel, A. Lebrun, C. Heller, R. Lavery, J.L. Viovy, D. Chatenay, F. Caron // Science. – 1996. – V. 271. – N 5250. – P. 792–794.
34. Cohen, S.R. Dynamic nanoindentation by instrumented nanoindentation and force microscopy: a comparative review / S.R. Cohen, E. Kalfon-Cohen, // Beilstein J. Nanotechnol. – 2013. – V. 4. – P. 815–833.

35. Cover, T. L. *Yersinia enterocolitica* / T.L. Cover, R.C. Aber // N. Engl. J. Med. – 1989. – V. 321. – N 1. – P. 16–24.
36. Cozens, D. Anti-adhesion methods as novel therapeutics for bacterial infections / D. Cozens, R.C. Read // Expert Rev. Anti Infect. Ther. – 2012. – V. 10. – N 12. – P. 1457–1468.
37. Cumpson, P.J. Calibration of AFM cantilever stiffness: a microfabricated array of reflective springs / P.J. Cumpson, P. Zhdan, J. Hedley // Ultramicroscopy – 2004. – V. 100. – P. 241–251.
38. Czerkies, M. An interplay between scavenger receptor A and CD14 during activation of J774 cells by high concentrations of LPS / M. Czerkies, K. Borzęcka, M. Zdioruk, A. Płóciennikowska, A. Sobota, K. Kwiatkowska // Immunobiology. – 2013. – V. 218. – N 10. – P. 1217–1226.
39. Dague, E. Probing in vitro interactions between *Lactococcus lactis* and mucins using AFM / E. Dague, D.T.L. Le, S. Zanna, P. Marcus, P. Loubiere, M. Mercier-Bonin // Langmuir. – 2010. – V. 26. – N 13. – P. 11010–11017.
40. Dammer, U. Binding Strength Between Cell Adhesion Proteoglycans Measured by Atomic Force Microscopy / U. Dammer, O. Popescu, P. Wagner, D. Anselmetti, H.J. Guntherodt, G.N. Misevic // Science. – 1995. – V. 267. – N 5201. – P. 1173–1175.
41. Darfeuille-Michaud, A. Adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* to the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture / A. Darfeuille-Michaud, D. Aubel, G. Chauviere, C. Rich, M. Bourges, A. Servin, B. Joly // Infect. Immun. – 1990. – V. 58. – N 4. – P. 893-902
42. Doyle, R.J. Contribution of the hydrophobic effect to microbial infection / R.J. Doyle // Microbes Infect. – 2000. – V. 2. – N 4. – P. 391–400.
43. Drake, B. Imaging crystals, polymers, and processes in water with the atomic force microscope / B. Drake, C.B. Prater, A.L. Weisenhorn, S.A. Gould, T.R. Albrecht, C.F. Quate, D.S. Cannell, H.G. Hansma, P.K. Hansma // Science. – 1989. – V. 243. – N 4898. – P. 1586–1589.

44. Dulin, D. Studying genomic processes at the single-molecule level: introducing the tools and applications / D. Dulin, J. Lipfert, M.C. Moolman, N.H. Dekker, // *Nat. Rev. Genet.* – 2013. – V. 14. – N 1. – P. 9–22.

45. Duperthuy, M. The major outer membrane protein OmpU of *Vibrio splendidus* contributes to host antimicrobial peptide resistance and is required for virulence in the oyster *Crassostrea gigas* / M. Duperthuy, J. Binesse, F. Le Roux, B. Romestand, A. Caro, P. Got, A. Givaudan, D. Mazel, E. Bachere, D. Destoumieux-Garzon // *Environ. Microbiol.* – 2010. – V. 12. – N 4. – P. 951–963.

46. Ebner, A. A new, simple method for linking of antibodies to atomic force microscopy tips / A. Ebner, L. Wildling, A.S.M. Kamruzzahan, C. Rankl, J. Wruss, C.D. Hahn, M. Holzl, R. Zhu, F. Kienberger, D. Blaas, P. Hinterdorfer, H.J. Gruber // *Bioconjug Chem.* – 2007. – V. 18. – N 4. – P. 1176–1184.

47. Ebner, A. Comparison of different aminofunctionalization strategies for attachment of single antibodies to AFM cantilevers / A. Ebner, P. Hinterdorfer, H.J. Gruber // *Ultramicroscopy.* – 2007. – V. 107. – N 10–11. – P. 922–927.

48. Ebner, A. Functionalization of AFM tips and supports for molecular recognition force spectroscopy and recognition imaging / A. Ebner, L. Wildling, H.J. Gruber // *Methods Mol. Biol.* – 2019. – V. 1886. – P. 117–151.

49. Elhelu, M.A. The Role of Macrophages in Immunology / M.A. Elhelu // *J. Natl. Med. Assoc.* – 1983. – V. 75. – N 3. – P. 314–317.

50. El-Kirat-Chatel, S. Nanoscale adhesion forces between the fungal pathogen *Candida albicans* and macrophages / S. El-Kirat-Chatel, Y.F. Dufrene // *Nanoscale Horiz.* – 2016. – V. 1. – N 1. – P. 69–74.

51. European Centre for Disease Prevention and Control. Yersiniosis. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2019. Stockholm: ECDC; 2021 Режим доступа: https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER-yersiniosis-2019_0.pdf (дата обращения: 14.03.2023).

52. Evans, E. Sensitive force technique to probe molecular adhesion and structural linkages at biological interfaces / E. Evans, K. Ritchie, R. Merkel. // *Biophys. J.* – 1995. – V. 68. – N 6. – P. 2580–2587.

53. Felek, S. Three *Yersinia pestis* adhesins facilitate Yop delivery to eukaryotic cells and contribute to plague virulence. / S. Felek, T.M. Tsang, E.S. Krukoniš // *Infect Immun.* – 2010. – V. 78. – N 10. – P. 4134–4150.
54. Florin, E.L. Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs / E.L. Florin, V.T. Moy, H.E. Gaub // *Science.* – 1994. – V. 264. – N 5157. – P. 415–417.
55. Fourel, D. Specific regions of *Escherichia coli* OmpF protein involved in antigenic and colicin receptor sites and in stable trimerization / D. Fourel, S. Mizushima, A. Bernadac, J.M. Pages // *J. Bacteriol.* – 1993. – V. 175. – N 9. – P. 2754–2757.
56. Gaboriaud, F. Spatially resolved force spectroscopy of bacterial surfaces using force-volume imaging / F. Gaboriaud, B.S. Parcha, M.L. Gee, J.A. Holden, R.A. Strugnell // *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* – 2008. – V. 62. – N 2. – P. 206–213.
57. Galimand, M. Resistance of *Yersinia pestis* to antimicrobial agents / M. Galimand, E. Carniel, P. Courvalin // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2006. – V. 50. – N 10. – P. 3233–3236.
58. Garcia, A.A. BCG cell imaging using scanning probe microscopy / A.A. Garcia, W.C. Pettigrew, J. Graham // *Scann. Microsc.* – 1993. – V. 7. – N 2. – P. 577–584.
59. Golkar, Z. Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis / Z. Golkar, O. Bagazra, D.G. Pace // *J. Infect. Dev. Ctries.* – 2014. – V. 8. – N 2. – P. 129–136.
60. Gould, I.M. New antibiotic agents in the pipeline and how they can overcome microbial resistance / I.M. Gould, A.M. Bal // *Virulence.* – 2013. – V. 4. – N 2. – P. 185–191.
61. Grandbois, M. How strong is a covalent bond? / M. Grandbois, M. Beyer, M. Rief, H. Clausen-Schaumann, H.E. Gaub // *Science.* – 1999. – V. 283. – N 5408. – P. 1727–1730.
62. Gunning, A.P. Use of Atomic Force Microscopy to Study the Multi-Modular Interaction of Bacterial Adhesins to Mucins / A.P. Gunning, D. Kavanaugh, E. Thursby, S. Etzold, D.A. MacKenzie, N. Juge // *Int. J. Mol. Sci.* – 2016. – V. 17. – N 11. – P. 1854.
63. Hansma, P.K. Tapping mode atomic force microscopy in liquids / P.K. Hansma, J.P. Cleveland, M. Radmacher, D.A. Walters, P.E. Hillner, M. Bezanilla, M. Fritz, D. Vie,

H.G. Hansma, C.B. Prater, J. Massie, L. Fukunaga, J. Gurley, V. Elings, // *Appl. Phys. Lett.* – 1994. – V. 64. – N 13. – 1738.

64. He, H. Silicon tip sharpening based on thermal oxidation technology / H. He, J. Zhang, J. Yang, F. Yang // *Microsyst. Technol.* – 2017. – V. 23. – N 6. – P. 1799–1803.

65. Hejair, H.M.A. Functional role of ompF and ompC porins in pathogenesis of avian pathogenic *Escherichia coli* / H.M.A. Hejair, Y. Zhu, J. Ma, Y. Zhang, Z. Pan, W. Zhang, H. Yao // *Microb. Pathog.* – 2017. – V. 107. – P. 29–37.

66. Helenius, J. Single-cell force spectroscopy / J. Helenius, C.P. Heisenberg, H.E. Gaub, D.J. Muller // *J. Cell. Sci.* – 2008. – V. 121. – N 11. – P. 1785–1791.

67. Henderson, E. Actin filament dynamics in living glial cells imaged by atomic force microscopy / E. Henderson, P.G. Haydon, D.S. Sakaguchi // *Science.* – 1992. – V. 257. – N 5078. – P. 1944–1946.

68. Hoffman, D.P. Correlative three-dimensional super-resolution and block-face electron microscopy of whole vitreously frozen cells / D.P. Hoffman, G. Shtengel, C.S. Xu, K.R. Campbell, M. Freeman, L. Wang, D.E. Milkie, H.A. Pasolli, N. Iyer, J.A. Bogovic, D.R. Stabley, A. Shirinifard, S. Pang, D. Peale, K. Schaefer, W. Pomp, C.-L. Chang, J. Lippincott-Schwartz, T. Kirchhausen, D.J. Solecki, E. Betzig, H.F. Hess // *Science.* – 2020. – V. 367. – N 6475. – eaaz5357.

69. Hoffmann, S.C. Functional analysis of bispecific antibody (EpCAMxCD3)mediated T-lymphocyte and cancer cell interaction by single-cell force spectroscopy / S.C. Hoffmann, G.H. Wabnitz, Y. Samstag, G. Moldenhauer, T. Ludwig // *Int. J. Cancer.* – 2011. – V. 128. – N 9. – P. 2096–2104.

70. Holbery, J.D. Experimental determination of scanning probe microscope cantilever spring constants utilizing a nanoindentation apparatus / J.D. Holbery, V.L. Eden, M. Sarikaya, R.M. Fisher // *Rev. Sci. Instrum.* – 2000. – V. 71. – 3769.

71. Holstein, T.W. Fibrous mini-collagens in hydra nematocysts / T.W. Holstein, M. Benoit, G. Vonherder, G. Wanner, C.N. David, H.E. Gaub // *Science.* – 1994. – V. 265. – N 5170. – P. 402–404.

72. Horber, J.K.H. A look at membrane patches with a scanning force microscope / J.K.H. Horber, J. Mosbacher, W. Haberle, J.P. Ruppertsberg, B. Sakmann // *Biophys. J.* – 1995. – V. 68. – N 5. – P. 1687–1693.

73. Hoshino, K. Cutting Edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product / K. Hoshino, O. Takeuchi, T. Kawai, H. Sanjo, T. Ogawa, Y. Takeda, K. Takeda, S. Akira // *J. Immunol.* – 1999. – V. 162. – N 7. – P. 3749–3752.

74. Huang, Z.H. Polydopamine ultrathin film growth on mica via In-Situ polymerization of dopamine with applications for silver-based antimicrobial coatings / Z.H. Huang, S.W. Peng, S.L. Hsieh, R. Kirankumar, P.F. Huang, T.M. Chang, A.K. Dwivedi, N.F. Chen, H.M. Wu, S. Hsieh // *Materials (Basel)*. – 2021. – V. 14. – N 3. – P. 1–16.

75. Huber, M. R-form LPS, the master key to the activation of TLR4/MD-2-positive cells. / M. Huber, C. Kalis, S. Keck, Z. Jiang, P. Georgel, X. Du, L. Shamel, S. Sovath, S. Mudd, B. Beutler, C. Galanos, M.A. Freudenberg // *Eur J Immunol.* – 2006. – V. 36. – N 3. – P. 701–711.

76. Hunter, P.J. Integration from proteins to organs: the Physiome Project / P.J. Hunter, T.K. Borg // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2003. – V. 4. – N 3. – P. 237–243.

77. Hutter, J.L. Calibration of atomic-force microscope tips / J.L. Hutter, J. Bechhoefer // *Rev. Sci. Instrum.* – 1993. – V. 64. – N 7. – P. 1868–1873.

78. Idiris, A. Force measurement for antigen-antibody interaction by atomic force microscopy using a photograft-polymer spacer / A. Idiris, S. Kidoaki, K. Usui, T. Maki, H. Suzuki, M. Ito, M. Aoki, Y. Hayashizaki, T. Matsuda // *Biomacromolecules.* – 2005. – V. 6. – N 5. – P. 2776–2784.

79. Jagtap, R. Overview literature on atomic force microscopy (AFM): Basics and its important applications for polymer characterization / R. Jagtap, A. Ambre // *Indian J. Eng. Mater. Sci.* – 2006. – V. 13. – P. 368–384.

80. Jalili, N. A review of atomic force microscopy imaging systems: application to molecular metrology and biological sciences / N. Jalili, K. Laxminarayana // *Mechatronics.* – 2004. – V. 14. – N 8. – P. 907–945.

81. Janovjak, H. Unfolding pathways of native bacteriorhodopsin depend on temperature / H. Janovjak, M. Kessler, D. Oesterhelt, H. Gaub, D.J. Muller // *EMBO J.* – 2003. – V. 22. – N 19. – P. 5220–5229.

82. Jansson, P.E. The chemistry of O-polysaccharide chains in bacterial lipopolysaccharides / P.E. Jansson, H. Brade, S.M. Opal, S.N. Vogel, D.C. Morrison // *Endotoxin in Health and Disease* / Marcel Dekker, Inc. – New York, 1999. – P. 155–78.

83. Jiang, Y. Measurement of the strength and range of adhesion using atomic force microscopy / Y. Jiang, K.T. Turner // *Extreme Mechanics Letters.* – 2016. – V. 9. – N 1. – P. 119–126.

84. Kasas, S. A method for anchoring round shaped cells for atomic force microscope imaging / S. Kasas, A.A. Ikai // *Biophys. J.* – 1995. – V. 68. – N 5. – P. 1678–1680.

85. Kasas, S. Biological applications of the AFM: From single molecules to organs / S. Kasas, N.H. Thomson, B.L. Smith, P.K. Hansma, J. Miklossy, H.G. Hansma // *Int. J. Imaging Syst. Technol.* – 1998. – V. 8. – N 2. – P. 151–161.

86. Keller, D. Scanning force microscopy of cells and membrane proteins / D. Keller, L. Chang, K. Luo, S. Singh, M. Yorgancioglu // *SPIE Proc.* – 1992. – V. 1639. – P. 91–101.

87. Khatibzadeh, N. Determination of motility forces on isolated chromosomes with laser tweezers / N. Khatibzadeh, A.B. Stilgoe, A.A. Bui, Y. Rocha, G.M. Cruz, V. Loke, L.Z. Shi, T.A. Nieminen, H. Rubinsztein-Dunlop, M.W. Berns // *Sci Rep.* – 2014. – V. 4. – N 6866. – P. 1–9.

88. Kim, S. The effect of humidity on the stability of an octadecyltriethoxysilane monolayer self-assembled on untreated and plasma-treated mica / S. Kim, H.K. Christenson, J.E. Curry // *Langmuir.* – 2002. – V. 18. – N 6. – P. 2125–2129.

89. Kim, S.J. Multiplexed singlemolecule assay for enzymatic activity on flow-stretched DNA / S.J. Kim, P.C. Blainey, C.M. Schroeder, X.S. Xie, // *Nat. Methods.* – 2007. – V. 4. – N 5. – P. 397–399.

90. Klebba, P. Determinants of OmpF porin antigenicity and structure / P. Klebba, S. Benson, S. Bala, T. Abdullah, J. Reid, S. Singh H. Nikaido // *J. Biol. Chem.* – 1990. – V. 265. – N 12. – P. 6800–6810.
91. Kline, K.A. Bacterial Adhesins in Host-Microbe Interactions / K.A. Kline, S. Fälker, S. Dahlberg, S. Normark, B. Henriques-Normark // *Cell Host Microbe.* – 2009. – V. 5. – N 6. – P. 580–592.
92. Knirel, Y.A. The structure of lipopolysaccharides of Gram-negative bacteria. III. The structure of O-antigens: a review / Y.A. Knirel, N.K. Kochetkov // *Biochemistry (Moscow).* – 1994. – V. 59. – P. 325–383.
93. Koehler, M. AFM-based force spectroscopy guided by recognition imaging: a new mode for mapping and studying interaction sites at low lateral density / M. Koehler, A. Fis, H.J. Gruber, P. Hinterdorfer // *Methods Protoc.* – 2019. – V. 2. – N 1. – 6.
94. Koster, D.A. Cellular strategies for regulating DNA supercoiling: a single-molecule perspective / D.A Koster, A. Crut, S. Shuman, M.A. Bjornsti, N.H. Dekker, // *Cell.* – 2010. – V. 142. – N 4. – P. 519–530.
95. Krasnoslobodtsev, A.V. Probing Interactions within the synaptic DNA-Sfil complex by AFM force spectroscopy / A.V. Krasnoslobodtsev, L.S. Shlyakhtenkoand, Y.L. Lyubchenko // *J. Mol. Biol.* – 2007. – V. 365. – N 5. – P. 1407–1416.
96. Kumar, S. Probing the machinery of intracellular trafficking with the atomic force microscope / S. Kumar, J.H. Hoh // *Traffic.* – 2001. – V. 2. – N 11. – P. 746–756.
97. Lal, R. Imaging real-time neurite outgrowth and cytoskeletal reorganization with an atomic force microscope / R. Lal, B. Drake, D. Blumberg, D.R. Saner, P.K. Hansma, C. Feinstein // *Am. J. Physiol.* – 1995. – V. 269. – N 1. – P. 275–285.
98. Lee, C.K. Atomic force microscopy: Determination of unbinding force, off rate and energy barrier for protein–ligand interaction / C.K. Lee, Y.M. Wang, L.S. Huang, S. Lin // *Micron.* – 2007. – V. 38. – N 5. – P. 446–461.
99. Lee, G.U. Direct measurement of the forces between complementary strands of DNA / G.U. Lee, L.A. Chriseyand, R.J. Colton // *Science.* – 1994. – V. 266. – N 5186. – P. 771–773.

100. Lee, G.U. Implementation of force differentiation in the immunoassay / G.U. Lee, S. Metzger, M. Natesan, C. Yanavich, Y.F. Dufrene // *Analytical Biochemistry*. – 2000. – V. 287. – N 2. – P. 261–271.
101. Lee, G.U. Sensing discrete streptavidin-biotin interactions with atomic force microscopy / G.U. Lee, D.A. Kidwell, R.J. Colton // *Langmuir*. – 1994. – V. 10. – N 2. – P. 354–357.
102. Lee, S. Chemical functionalization of AFM cantilevers / S. Lee // *Department of Materials Science and Engineering*. – 2005. – P. 1–52.
103. Leo, J.C. Adhesins of human pathogens from the genus *Yersinia* / J.C. Leo, M. Skurnik // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2011. – V. 715. – P. 1–15.
104. Li, M. Imaging and force recognition of single molecular behaviors using atomic force microscopy / M. Li, D. Dang, L. Liu, N. Xi, Y. Wang // *Sensors (Basel)*. – 2017. – V. 17. – N 1. – 200.
105. Li, Y. Molecular recognition force spectroscopy study of the dynamic interaction between aptamer GBI-10 and extracellular matrix protein tenascin-C on human glioblastoma cell / Y. Li, H. Qiao, W. Yan, J. Zhang, C. Xing, H. Wang, B. Zhang, J. Tang // *J. Mol. Recognit.* – 2013. – V. 26. – N 1. – P. 46–50.
106. Li, Y.Q. Direct measurement of interaction forces between colloidal particles using the scanning force microscope / Y.Q. Li, N.J. Tao, J. Pan, A.A. Garcia, S.M. Lindsay // *Langmuir*. – 1993. – V. 9. – N 3. – P. 637–641.
107. Lin, W.-C. Lipid asymmetry in DLPC/DSPC-supported lipid bilayers: a combined AFM and fluorescence microscopy study / W.-C. Lin, C.D. Blanchette, T.V. Ratto, M.L. Longo // *Biophys J.* – 2006. – V. 90. – N 1. – P. 228–237.
108. Lindler, L.E. (1990). *Yersinia pestis* pH 6 antigen: genetic, biochemical, and virulence characterization of a protein involved in the pathogenesis of bubonic plague / Lindler, L.E., Klempner M.S., Straley S.C. // *Infect. Immun.* – 1990. – V. 58. – N 8. – P. 2569–2577.
109. Lipfert, J. Quantitative modeling and optimization of magnetic tweezers / J. Lipfert, X. Hao, N.H. Dekker, // *Biophys. J.* – 2009. – V. 96. – N 12. – P. 5040–5049.

110. Lu, Q. Understanding the molecular interactions of lipopolysaccharides during *E. coli* initial adhesion with a surface forces apparatus / Q. Lu, J. Wang, A. Faghijnejad, H. Zeng, Y. Liu // *SoftMatter*. – 2011. – V. 7. – N 19. – P. 9366–9379.

111. Lv, Z. Probing specific interaction forces between human IgG and rat anti-human IgG by self-assembled monolayer and atomic force microscopy / Z. Lv, J. Wang, G. Chen, L. Deng // *Nanoscale Res. Lett.* – 2010. – V. 5. – N 6. – P. 1032–1038.

112. Mahnke, K. CD14 is expressed by subsets of murine dendritic cells and upregulated by lipopolysaccharide / K. Mahnke, E. Becher, P. Ricciardi-Castagnoli, T.A. Luger, T. Schwarz, S. Grabbe // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 1997. – V. 417. – P. 145–159.

113. Matsuura, M. Immunomodulatory effects of *Yersinia pestis* lipopolysaccharides on human macrophages / M. Matsuura, H. Takahashi, H. Watanabe, S. Saito, K. Kawahara // *Clin. Vaccine Immunol.* – 2010. – V. 17. – N 1. – P. 49–55.

114. Matsuura, M. Structural Modifications of Bacterial Lipopolysaccharide That Facilitate Gram-Negative Bacteria Evasion of Host Innate Immunity / M. Matsuura // *Frontiers in Immunology* – 2013. – V. 4. – N 109. – P. 1–10.

115. Medalsy, I. Imaging and quantifying chemical and physical properties of native proteins at molecular resolution by force-volume AFM / I. Medalsy, U. Hensen, D.J. Muller, // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2011. – V. 50. – N 50. – P. 12103–12108.

116. Merkel, R. Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy / R. Merkel, P. Nassoy, A. Leung, K. Ritchie, E. Evans // *Nature*. – 1999. – V. 397. – N 6714. – P. 50–53.

117. Michael, C.A. The antibiotic resistance crisis: causes, consequences, and management / C.A. Michael, D. Dominey-Howes, M. Labbate // *Front Public Health*. – 2014. – V. 2. – N 145. – P. 1–8.

118. Migneault, I. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking / I. Migneault, C. Dartiguenave, M.J. Bertrand, K.C. Waldron // *Biotechniques*. – 2004. – V. 37. – N 5. – P. 790–796.

119. Mikula, K.M. *Yersinia* infection tools-characterization of structure and function of adhesins / K.M. Mikula, R. Kolodziejczyk, A. Goldman // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* – 2013. – V. 2. – N 169. – P. 1–14.

120. Miller, V. L. Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells / V. L. Miller, S. Falkow, // *Infect. Immun.* – 1988. – V. 56. – N 5. – P. 1242–1248.
121. Miller, V.L. Nucleotide sequence of the *Yersinia enterocolitica* ail gene and characterization of the Ail protein product / V.L. Miller, J.B. Bliska, S. Falkow // *J. Bacteriol.* – 1990. – V. 172. – N 2. – P. 1062–1069.
122. Miyazaki, T. The role of macrophages in antigen presentation and T cell tolerance / T. Miyazaki, G. Suzuki, K. Yamamura // *Int. Immunol.* – 1993. – V. 5. – N 9. – P. 1023–1033.
123. Moran, A.P. Relevance of fucosylation and Lewis antigen expression in the bacterial gastroduodenal pathogen *Helicobacter pylori* / A.P. Moran // *Carbohydrate Research.* – 2007. – V. 343. – N 12. – P. 1952–1965.
124. Neuman, K.C. Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy / K.C. Neuman, A. Nagy // *Nat. Methods.* – 2008. – V. 5. – N 6. – P. 491–505.
125. Neumeister, J.M. Lateral, normal, and longitudinal spring constants of atomic force microscopy cantilevers / J.M. Neumeister, W.A. Ducker // *Rev. Sci. Instrum.* – 1994. – V. 65. – N 8. – P. 2527–2531.
126. Nguyen-Tri, P. Recent Applications of Advanced Atomic Force Microscopy in Polymer Science: A Review / P. Nguyen-Tri, P. Ghassemi, P. Carriere, S. Nanda, A.A. Assadi, D.D. Nguyen // *Polymers (Basel).* – 2020. – V. 12. – N 5. – 1142.
127. Novotny, J. Simple fabrication of structured magnetic metallic nano-platelets for bio-analytical applications / J. Novotny, P. Juskova, R. Kupcik, Z. Bilkova, F. Foret // *Micromachines (Basel).* – 2019. – V. 10. – N 2. – 106.
128. Ofek, I. Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems / I. Ofek, D.L. Hasty, N. Sharon // *FEMS Immunology & Medical Microbiology.* – 2003. – V. 38. – N 3. – P. 181–191.
129. Ofek, I. Common themes in bacterial adhesion / I. Ofek, R.J. Doyle // *Bacterial Adhesion to Cells and Tissues* / Chapman&Hall. – New York, 1994. – P. 513–562.

130. Ogawa, T. Chemical structure and immunobiological activity of Porphyromonas gingivalis lipid A / T. Ogawa, Y. Asai, Y. Makimura, R. Tamai // *Frontiers in Bioscience*. – 2007. – V. 12. – N 10. – P. 3795–3812.
131. Palmer, J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm / J. Palmer, S. Flint, J. Brooks // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 2007. – V. 34. – N 9. – P. 577–588.
132. Park Systems Phase Imaging/Phase Detection Microscopy. 2020. Режим доступа: <https://www.parksystems.com/park-spm-modes/91-standard-imaging-mode/221-phase-imaging-phase-detection-microscopy-pdm> (дата обращения: 14.03.2023).
133. Park, B.S. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4–MD-2 complex / B.S. Park, D.H. Song, H.M. Kim, B.S. Choi, H. Lee, J.O. Lee // *Nature*. – 2009. – V. 458. – N 7242. – P. 1191–1195.
134. Perry, R.D. *Yersinia pestis* – etiologic agent of plague / R.D. Perry, J.D. Fetherston // *Clin. Microbiol. Rev.* – 1997. – V. 10. – N 1. – P. 35–66.
135. Piddock, L.J. The crisis of no new antibiotics — what is the way forward? / L.J. Piddock // *Lancet Infect. Dis.* – 2012. – V. 12. – N 3. – P. 249–253.
136. Pierson, D.E. The ail gene of *Yersinia enterocolitica* has a role in the ability of the organism to survive serum killing / D.E. Pierson, S. Falkow, // *Infect. Immun.* – 1993. – V. 61. – N 5. – P. 1846–1852.
137. Pleshakova, T.O. Atomic force microscopy for protein detection and their physicochemical characterization / T.O. Pleshakova, N.S. Bukharina, A.I. Archakov, Y.D. Ivanov // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – V. 19. – N 4. – 1142.
138. Power, R.M. A guide to light-sheet fluorescence microscopy for multiscale imaging / R.M. Power, J. Huisken // *Nature Methods*. – 2017. – V. 14. – P. 360–373.
139. Puech, P.H. A new technical approach to quantify cell-cell adhesion forces by AFM / P.H. Puech, K. Poole, D. Knebel, D.J. Muller // *Ultramicroscopy* – 2006. – V. 106. – N 8–9. – P. 637–644.
140. Rabinovich, Y.I. Use of atomic force microscope for the measurements of hydrophobic forces between silanated silica plate and glass sphere / Y.I. Rabinovich, R.H. Yoon // *Langmuir*. – 1994. – V. 10. – N 6. – P. 1903–1909.

141. Radmacher, M. From molecules to cells: imaging soft samples with the atomic force microscope / M. Radmacher, R.W. Tillmann, M. Fritz, H.E. Gaub // *Science*. – 1992. – V. 257. – N 5078. – P. 1900–1905.
142. Radmacher, M. Mapping interaction forces with the atomic force microscope / M. Radmacher, J.P. Cleveland, M. Fritz, H.G. Hansma, P.K. Hansma // *Biophys. J.* – 1994. – V. 66. – N 6. – P. 2159–2165.
143. Raetz, C.R.H. Lipopolysaccharide Endotoxins / C.R.H. Raetz, C. Whitfield // *Annu. Rev. Biochem.* – 2002. – V. 71. – P. 635–700.
144. Rajagopal, V. The Cell Physiome: What Do We Need in a Computational Physiology Framework for Predicting Single-Cell Biology? / V. Rajagopal, S. Arumugam, P.J. Hunter, A. Khadangi, J. Chung, M. Pan // *Annual Review of Biomedical Data Science*. – 2022. – V. 5. – P. 341–366.
145. Rajan, V.S. Unraveling the receptor-ligand interactions between bladder cancer cells and the endothelium using AFM / V.S. Rajan, V.M. Laurent, C. Verdier, A. Duperray // *Biophys. J.* – 2017. – V. 112. – N 6. – P. 1246–1257.
146. Read, A.F. Antibiotic resistance management / A.F. Read, R.J. Woods // *Evol. Med. Public Health*. – 2014. – V. 2014. – N 1. – P. 147.
147. Ribeck, N. Multiplexed single-molecule measurements with magnetic tweezers / N. Ribeck, O.A. Saleh // *Rev. Sci. Instrum.* – 2008. – V. 79. – N 9. – P. 1–7.
148. Richter, W. Morphology, size distribution, and aggregate structure of lipopolysaccharide and lipid A dispersions from enterobacterial origin / W. Richter, V. Vogel, J. Howe, F. Steiniger, F. Brauser, M.H.J. Koch, M. Roessle, T. Gutschmann, P. Garidel, W. Mäntele, K. Brandenburg // *Innate Immunity*. – 2010. – V. 17. – N 5. – P. 1–12.
149. Rief, M. Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM / M. Rief, M. Gautel, F. Oesterhelt, J.M. Fernandez, H.E. Gaub // *Science*. – 1997. – V. 276. – N 5315. – P. 1109–1112.
150. Riener, C.K. Simple test system for single molecule recognition force microscopy / C.K. Riener, C.M. Stroh, A. Ebner, C. Klampfl, A.A. Gall, C. Romanin, Y.L.

Lyubchenko, P. Hinterdorfer, H.J. Gruber // *Anal. Chim. Acta.* – 2003. – V. 479. – N 1. – P. 59–75.

151. Roes, S. Localization of the lipopolysaccharide-binding protein in phospholipid membranes by atomic force microscopy / S. Roes, F. Mumm, U. Seydel, T. Gutschmann // *J. Biol. Chem.* – 2006. – V. 281. – N 5. – P. 2757–2763.

152. Rolhion, N. OmpC and the sigma(E) regulatory pathway are involved in adhesion and invasion of the Crohn's disease-associated *Escherichia coli* strain LF82 / N. Rolhion, F.A. Carvalho, A. Darfeuille-Michaud // *Mol. Microbiol.* – 2007. – V. 63. – N 6. – P. 1684–1700.

153. Rolhion, N. Strong decrease in invasive ability and outer membrane vesicle release in Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 with the yfgL gene deleted / N. Rolhion, N. Barnich, L. Claret, A. Darfeuille-Michaud // *J. Bacteriol.* – 2005. – V. 187. – N 7. – P. 2286–2296.

154. Sabroe, I. Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses / I. Sabroe, E.C. Jones, L.R. Usher, M.K.B. Whyte, S.K. Dower // *J. Immunol.* – 2002. – V. 168. – N 9. – P. 4701–4710.

155. Sader, J.E. Calibration of atomic force microscope cantilevers / J.E. Sader // *Encyclopedia of Surface and Colloid Science* – Santa Barbara, 2002. – P. 846–856.

156. Sader, J.E. Method for the calibration of atomic force microscope cantilevers / J.E. Sader, I. Larson, P. Mulvaney, L.R. White // *Rev. Sci. Instrum.* – 1998. – V. 66. – N 7. – P. 3789–3798.

157. Santos, N.C. Evaluation of lipopolysaccharide aggregation by light scattering spectroscopy / N.C. Santos, A.C. Silva, M.A. Castanho, J. Martins-Silva, C. Saldanha // *Chembiochem.* – 2003. – V. 4. – N 1. – P. 96–100.

158. Schmitz, I. Phase imaging as an extension to tapping mode AFM for the identification of material properties on humidity-sensitive surfaces / I. Schmitz, M. Schreiner, G. Friedbacher, M. Grasserbauer // *Applied Surface Science* – 1997. – V. 115. – N 2. – P. 190–198.

159. Schoenenberger, C.A. Slow cellular dynamics in MDCK and R5 cells monitored by time-lapse atomic force microscopy / C.A. Schoenenberger, J.H. Hoh // *Biophys. J.* – 1994. – V. 67. – N 2. – P. 929–936.
160. Senapati, S. Recent progress in molecular recognition imaging using atomic force microscopy / S. Senapati, S. Lindsay // *Acc. Chem. Res.* – 2016. – V. 49. – N 3. – P. 503–510.
161. Senden, T.J. Experimental determination of spring constants in atomic force microscopy / T.J. Senden, W.A. Duckert // *Langmuir.* – 1994. – V. 10. – N 4. – P. 1003–1004.
162. Sengupta, S. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature / S. Sengupta, M.K. Chattopadhyay, H.P. Grossart // *Front Microbiol.* – 2013. – V. 4. – N 47. – P. 1–13.
163. Shang, H. Magnetic tweezers measurement of the bond lifetime-force behavior of the IgG-protein A specific molecular interaction / H. Shang, G.U. Lee // *J. Am. Chem. Soc.* – 2007. – V. 129. – N 20. – P. 6640–6646.
164. Shimazu, R. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4 / R. Shimazu, S. Akashi, H. Ogata, Y. Nagai, K. Fukudome, K. Miyake, M. Kimoto // *J. Exp. Med.* – 1999. – V. 189. – N 11. – P. 1777–1782.
165. Shoaf-Sweeney, K.D. Adherence, anti-adherence, and oligosaccharides preventing pathogens from sticking to the host / K.D. Shoaf-Sweeney, R.W. Hutkins // *Adv. Food Nutr. Res.* – 2009. – V. 55. – P. 101–161.
166. Simon, M. Self-assembling nanocomplexes from insulin and water-soluble branched polyesters, poly [(vinyl-3-(diethylamino)-propylcarbamate-co-(vinyl acetate)-co-(vinyl alcohol)]-graft-poly (l-lactic acid): A novel carrier for transmucosal delivery of peptides. / M. Simon, M. Wittmar, U. Bakowsky, T. Kissel // *Bioconjug Chem.* – 2004. – V. 15. – N 4. – P. 841–849.
167. Smith, A.S. Force-induced growth of adhesion domains is controlled by receptor mobility / A.S. Smith, K. Sengupta, S. Goennenwein, U. Seifert, E. Sackmann // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2008. – V. 105. – N 19. – P. 6906–6911.

168. Smith, S.B. Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads / S.B. Smith, L. Finzi, C. Bustamante, // *Science*. – 1992. – V. 258. – N 5085. – P. 1122–1126.
169. Solanki, V. Host-bacteria interaction and adhesin study for development of therapeutics / V. Solanki, M. Tiwari, V. Tiwari // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2018. – V. 112. – P. 54–64.
170. Su, H. Chlamydia trachomatis-host cell interactions: role of the chlamydial major outer membrane protein as an adhesin / H. Su, N.G. Watkins, Y.X. Zhang, H.D. Caldwell // *Infect. Immun.* – 1990. – V. 58. – N 4. – P. 1017–1025.
171. Svoboda, K. Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry / K. Svoboda, C.F. Schmidt, B.J. Schnapp, S.M. Block // *Nature* – 1993. – V. 365. – N 6448. – P. 721–727.
172. Taheri-Araghi, S. Single-Cell Physiology / S. Taheri-Araghi, S.D. Brown, J.T. Sauls, D.B. McIntosh, S. Jun // *Annual Review of Biophysics*. – 2015. – V. 44. – P. 123–142.
173. Tanase, M. Magnetic tweezers in cell biology / M. Tanase, N. Biais, M. Sheetz // *Methods Cell Biol.* – 2007. – V. 83. – P. 473–493.
174. Tao, N.J. Measuring the microelastic properties of biological material / N.J. Tao, S.M. Lindsay, S. Lees // *Biophys. J.* – 1992. – V. 63. – N 4. – P. 1165–1169.
175. Targosz, M. Influence of macrophage activation on their capacity to bind bacterial antigens studied with atomic force microscopy / M. Targosz, A. Labuda, P. Czuba, R. Biedron, M. Strus, A. Gamian, J. Marcinkiewicz, M. Szymonski // *Nanomedicine*. – 2006. – V. 2. – N 2. – P. 82–88.
176. Targosz, M. Molecular interaction between bacterial antigens and macrophage receptors studied by atomic force microscopy / M. Targosz, P. Czuba, R. Biedron, M. Strus, A. Gamian, J. Marcinkiewicz, M. Szymonski // *Acta Physica Polonica A*. – 2006. – V. 109. – N 3. – P. 421–426.
177. The antibiotic alarm // *Nature*. – 2013. – V. 495. – N 7440. – P. 141.

178. Tsang, T.M. Ail binding to fibronectin facilitates *Yersinia pestis* binding to host cells and Yop delivery / T.M. Tsang, S. Felek, E.S. Krukoniš // *Infect Immun.* – 2010. – V. 78. – N 8. – P. 3358–3368.

179. Ulevitch, R.J. Recognition of Gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system / R.J. Ulevitch, P.S. Tobias // *Curr. Opin. Immunol.* – 1999. – V. 11. – N 1. – P. 19–22.

180. Vaure, C. A Comparative Review of Toll-Like Receptor 4 Expression and Functionality in Different Animal Species / C. Vaure, Y. Liu // *Front Immunol.* – 2014. – V. 5. – P. 316.

181. Ventola, C.L. The antibiotic resistance crisis, part 1: causes and threats / C.L. Ventola // *P T.* – 2015. – V. 40. – N 4. – P. 277–283.

182. Vlaminc, I.D. Highly parallel magnetic tweezers by targeted DNA tethering / I.D. Vlaminc, T. Henighan, M.T.J. Loenhout, I. Pfeiffer, J. Huijts, J.W.J. Kerssemakers, A.J. Katan, A. Langen-Suurling, E. Drift, C. Wyman, C. Dekker // *Nano Lett.* – 2011. – V. 11. – N 12. – P. 5489–5493.

183. Wang, C. Evaluating interaction forces between BSA and rabbit anti-BSA in sulphathiazole sodium, tylosin and levofloxacin solution by AFM / C. Wang, J. Wang, L. Deng // *Nanoscale Res. Lett.* – 2011. – V. 6. – N 1. – P. 579.

184. Wang, H. Glutaraldehyde modified mica: a new surface for atomic force microscopy of chromatin / Wang, H. Bash R., Yodh J.G., Hager G.L., Lohr D., Lindsay S.M. // *Biophys. J.* – 2002. – V. 83. – N 6. – P. 3619–3625.

185. Westphal, O. Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol water and further applications of the procedure / O. Westphal, K. Jann // *Methods Carbohydr. Chem.* – 1965. – V. 5. – P. 83–91.

186. Wickham, T.J. General analysis of receptor-mediated viral attachment to cell surfaces / T.J. Wickham, R.R. Granados, H.A. Wood, D.A. Hammer, M.L. Shuler // *Biophys. J.* – 1990. – V. 58. – N 6. – P. 1501–1516.

187. Wildling, L. Linking of sensor molecules with amino groups to amino-functionalized AFM tips / L. Wildling, B. Unterauer, R. Zhu, A. Rupprecht, T.

Haselgrübler, C. Rankl, A. Ebner, D. Vater, P. Pollheimer, E.E. Pohl, P. Hinterdorfer, H.J. Gruber // *Bioconjug. Chem.* – 2011. – V. 22. – N 6. – P. 1239–1248.

188. Willemsen, O.H. Simultaneous height and adhesion imaging of antibody-antigen interactions by atomic force microscopy / O.H. Willemsen, M.M. Snel, K.O. van der Werf, B.G. de Grooth, J. Greve, P. Hinterdorfer, H.J. Gruber, H. Schindler, Y. van Kooyk, C.G. Figdor // *Biophys. J.* – 1998. – V. 75. – N 5. – P. 2220–2228.

189. World Health Organization. Facts about plague. 2017. Режим доступа: https://cdn.who.int/media/images/default-source/infographics/plague-february-2017-jpg.jpg?sfvrsn=af65c05c_0 (дата обращения: 14.03.2023).

190. Wright, G.D. Something new: revisiting natural products in antibiotic drug discovery / G.D. Wright // *Can. J. Microbiol.* – 2014. – V. 60. – N 3. – P. 147–154.

191. Xu, C.S. An open-access volume electron microscopy atlas of whole cells and tissues / C.S. Xu, S. Pang, G. Shtengel, A. Müller, A.T. Ritter, H.K. Hoffman, S.-Y. Takemura, Z. Lu, H.A. Pasolli, N. Iyer, J. Chung, D. Bennett, A.V. Weigel, M. Freeman, S.B. van Engelenburg, T.C. Walther, R.V. Farese Jr., J. Lippincott-Schwartz, I. Mellman, M. Solimena, H.F. Hess // *Nature.* – 2021. – V. 599. – N 7883. – P. 147–151.

192. Yang, K. Host Langerin (CD207) is a receptor for *Yersinia pestis* phagocytosis and promotes dissemination / K. Yang, C.G. Park, C. Cheong, S. Bulgheresi, S. Zhang, P. Zhang, Y. He, L. Jiang, H. Huang, H. Ding, Y. Wu, S. Wang, L. Zhang, A. Li, L. Xia, S.S. Bartra, G.V. Plano, M. Skurnik, J.D. Klena, T. Chen // *Immunol Cell Biol.* – 2015. – V. 93. – N 9. – P. 815–824.

193. Yang, K. *Yersinia pestis* Interacts With SIGNR1 (CD209b) for Promoting Host Dissemination and Infection / K. Yang, Y. He, C.G. Park, Y.S. Kang, P. Zhang, Y. Han, Y. Cui, S. Bulgheresi, A.P. Anisimov, S.V. Dentovskaya, X. Ying, L. Jiang, H. Ding, O.A. Njiri, S. Zhang, G. Zheng, L. Xia, B. Kan, X. Wang, H. Jing, M. Yan, W. Li, Y. Wang, X. Xiamu, G. Chen, D. Ma, S.S. Bartra, G.V. Plano, J.D. Klena, R. Yang, M. Skurnik, T. Chen // *Front. Immunol.* – 2019. – V. 10. – P. 96.

194. Zaltron, A. Optical tweezers in single-molecule experiments / A. Zaltron, M. Merano, G. Mistura, C. Sada, F. Seno // *The European Physical Journal Plus.* – 2020. – V. 135. – N 896 – P. 1–33.

195. Zav'yalov, V. Adhesive organelles of Gram-negative pathogens assembled with the classical chaperone/usher machinery: structure and function from a clinical standpoint / V. Zav'yalov, A. Zavialov, G. Zav'yalova, T. Korpela // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2010. – V. 34. – N 3. – P. 317–378.

196. Zeng, G. Nanomechanics of amyloid materials studied by atomic force microscopy / G. Zeng, Y. Duan, F. Besenbacher, M. Dong // *Atomic Force Microscopy Investigations into Biology - From Cell to Protein / InTech.* – 2012. – P. 153–174.

197. Zhang, H. Optical tweezers for single cells / H. Zhang, K.K. Liu // *J. R. Soc. Interface.* – 2008. – V. 5. – N 24. – P. 671–690.

198. Zhang, W. Single polymer chain elongation of poly(N-isopropylacrylamide) and poly(acrylamide) by atomic force microscopy / W. Zhang, S. Zou, C. Wang, X. Zhang // *J. Phys. Chem. B.* – 2002. – V. 104. – N 44. – P. 10258–10264.

199. Zhang, X. Force spectroscopy of the leukocyte function-associated antigen-1/intercellular adhesion molecule-1 interaction / X. Zhang, E. Wojcikiewicz, V.T. Moy // *Biophys. J.* – 2002. – V. 83. – N 4. – P. 2270–2279.

200. Zuttion, F. Anti-adhesive effect of glycoclusters on *Pseudomonas aeruginosa* bacteria adhesion to epithelial cells studied by AFM Single Cell Force Spectroscopy / F. Zuttion, C. Ligeour, O. Vidal, M. Wälte, F. Morvan, S. Vidal, J.J. Vasseur, Y. Chevolut, M. Phaner-Goutorbe, H. Schillers // *Nanoscale.* – 2018. – V. 10. – N 26. – P. 12771–12778.