

УДК 577.32

СИЛОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *Yersinia pestis* С РЕЦЕПТОРАМИ TLR4 И CD14 МАКРОФАГОВ J774: АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ

© 2023 г. В. С. Белозёров^{a, b}, Б. А. Ананченко^a, И. В. Коньшев^{a, b}, Л. Г. Дудина^{a, b},
С. А. Коннова^c, Э. В. Рожина^c, Р. Ф. Фахруллин^c, А. А. Бывалов^{a, b, *}

^aВятский государственный университет,
г. Киров, 610000 Российская Федерация

^bИнститут физиологии Коми научного центра Уральского отделения РАН,
г. Сыктывкар, Республика Коми, 167982 Россия

^cИнститут фундаментальной медицины и биологии,
Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань,
Приволжский федеральный округ, Республика Татарстан, 420008 Россия

*e-mail: byvalov@nextmail.ru

Поступила в редакцию 04.02.2023 г.

После доработки 09.03.2023 г.

Принята к публикации 12.03.2023 г.

Одной из основных стадий инфекционного процесса, которая во многом определяет течение и исход заболевания, является первичный контакт возбудителя с клетками хозяина. Ключевую роль в таком взаимодействии грамотрицательных бактерий с иммунокомпетентными клетками макроорганизма играет липополисахарид наружной мембраны, инициирующий запуск и развитие иммунных реакций путем взаимодействия с рядом специфических рецепторов, в первую очередь CD14 и TLR4. Цель настоящей работы состояла в количественном определении методом атомно-силовой микроскопии силовых характеристик взаимодействия липополисахарида *Yersinia pestis* вакцинного штамма EV с рецепторами CD14 и TLR4 на поверхности мышинных макрофагов J774. Препарат липополисахарида выделяли из клеток *Y. pestis* вакцинного штамма EV, выращенных при 27°C. Для оценки экспрессии рецепторов на поверхности клеток применяли метод флуоресцентной и конфокальной микроскопии. С использованием моноклональных антител к рецепторам CD14 и TLR4 методом силовой спектроскопии оценивали силовые характеристики взаимодействия липополисахарида на поверхности зонда (иглы) кантилевера с клетками макрофагов J774. В работе были подобраны условия иммобилизации на стекле мышинных макрофагов линии J774, позволяющие проводить сканирование их поверхности и оценивать силу адгезии к клеткам целевых антигенов методом атомно-силовой микроскопии. Инкубация иммобилизованных макрофагов в растворах с моноклональными антителами к рецепторам CD14 и TLR4 вызывала снижение основных силовых характеристик взаимодействия в системе макрофаг J774 – липополисахарид *Y. pestis* по сравнению с интактными, необработанными клетками. Аналогичный эффект зарегистрирован после предварительной обработки клеток раствором того же препарата липополисахарида без моноклональных антител. Полученные результаты свидетельствуют о способности липополисахарида, химически связанного с зондом, взаимодействовать с рецепторами CD14 и TLR4 на поверхности макрофагов.

Ключевые слова: липополисахарид, *Yersinia pestis*, рецепторы CD14 и TLR4, макрофаги J774, атомно-силовая микроскопия

DOI: 10.31857/S0233475523040035, **EDN:** OJPGSD

ВВЕДЕНИЕ

Клиническая картина и исход бактериальных инфекций во многом определяются результатом первичного взаимодействия патогена с клетками хозяина, в первую очередь эпителиальными и иммунокомпетентными. Указанное взаимодействие опосредуется поверхностными антигенами возбудителя, связанными с телом клетки или нахо-

дящимися в межклеточном пространстве. Одним из таких антигенов грамотрицательных бактерий является липополисахарид (ЛПС), основной структурный компонент наружной мембраны, способный выделяться в окружающую микробную клетку среду. Этот антиген участвует в реализации многих важных функций бактерий в организме хозяина, в том числе индуцируя развитие процессов врожденного и приобретенного иммунитета [1].

Клетки млекопитающих способны продуцировать молекулы, которые с той или иной степенью специфичности могут связываться с определенными объектами внешней среды биотической и абиотической природы. Среди таких молекул есть белки, играющие ключевую роль во взаимодействии с патогенными микроорганизмами и клетками индигенной микрофлоры. Установлена способность клеток *Yersinia pestis* связываться с поверхностью эукариотических клеток или компонентами внеклеточного матрикса посредством таких адгезинов, как Pla, Psa, YadBC, Ail [2]. Показана способность аутотранспортера YnfF *Y. pestis*, иммобилизованного на поверхности полистирольных микросфер, связываться с макрофагами J774 [3].

На начальных этапах проникновения грамотрицательных бактерий в организм хозяина особое значение имеют рецепторы CD14 и TLR4 иммунокомпетентных клеток. Показано, что при инфицировании макроорганизма минимальные количества ЛПС в не связанной с микробной клеткой форме попадают в кровь, где в комплексе с липополисахарид-связывающим белком ЛПС может связываться с рецептором CD14, который находится в растворимом виде или связан с поверхностью макрофагов. Белок CD14 расщепляет агрегаты ЛПС до субъединичных молекул, которые взаимодействуют с TLR4-MD2, что приводит к активации ряда сигнальных молекул, в том числе провоспалительных цитокинов [4, 5]. Это способствует элиминации патогена из инфицированного организма. Вместе с тем такого механизма защитной реакции может оказаться недостаточно, что может привести к генерализации инфекционного процесса, в том числе к септическому шоку, опосредуемому и эндотоксином возбудителя. Японскими авторами установлено, что ЛПС *Y. pestis* как в водорастворимой форме, так и в связанном с клеткой виде может и напрямую взаимодействовать с рецептором TLR4 на поверхности макрофагов человека U937, причем клетки культур, выращенных при 27°C и 37°C, а также препараты ЛПС, выделенные из этих культур (ЛПС-27 и ЛПС-37 соответственно), вызывали различные эффекты. Так, водорастворимый ЛПС-27, равно как и инактивированные формалином бактерии, выращенные при 27°C, за счет связанного с клеткой ЛПС-27 стимулируют воспалительную реакцию, опосредованную рецептором TLR4. ЛПС-37, напротив, проявлял выраженную антагонистическую активность в отношении TLR4-опосредованного воспалительного ответа. Иные результаты были получены при использовании макрофагов мыши линии RAW264.7: оба препарата ЛПС оказывали провоспалительное действие, но обработка клеток препаратом ЛПС-27 вызывала на три порядка более сильную продукцию провоспалительных цитокинов [6]. Помимо указанных ме-

ханизмов взаимодействия ЛПС с иммунокомпетентными клетками, характерного для многих грамотрицательных бактерий, *Y. pestis* может связываться посредством кора ЛПС с рецептором SIGNR1 (CD209b) антиген-презентирующих клеток, что способствует быстрому распространению-патогена в организме хозяина [7].

Несмотря на то, что многие стороны взаимодействия бактерий *Y. pestis* с клетками макроорганизма исследованы достаточно глубоко, отдельные особенности первичного контакта про- и эукариотической клетки нуждаются в дополнительном изучении, в том числе биофизическими методами. Представляет несомненный интерес, в частности, количественная оценка силы связи между иммунокомпетентными клетками хозяина и микробной клеткой или ее поверхностными антигенами, значимость которых в качестве лигандов возбудителя, взаимодействующих с рецепторами эукариотической клетки, экспериментально установлена или предполагается. Цель работы состояла в определении методом атомно-силовой микроскопии участия рецепторов CD14 и TLR4 во взаимодействии ЛПС *Y. pestis* с макрофагами J774.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа с клеточными культурами. Мышиные макрофаги линии J774 (Российская коллекция клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН) выращивали в культуральных флаконах 25 см² (Jet Biofil, Китай) с жидкой питательной средой DMEM с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (БиолоТ, Россия) в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C в атмосфере углекислого газа (5%). С использованием раствора Версена клетки переносили в полистироловые чашки, на дно которых были помещены покровные стекла, и культивировали при описанных выше условиях в течение 18–22 ч.

Для проведения экспериментов по силовой спектроскопии клетки J774 после инкубации на покровных стеклах трехкратно промывали питательной средой DMEM и к клеткам добавляли питательную среду, в которой содержались мышиные моноклональные антитела к рецепторам TLR4 или CD14 (Novus Biologicals, США) в концентрации 1 мкг/мл или препарат ЛПС *Y. pestis* EV в концентрации 100 мкг/мл. В качестве контроля использовали клетки, которые инкубировали в питательной среде без добавления антител. Далее чашки с клетками 30 мин инкубировали в CO₂-инкубаторе (37°C, 5% CO₂). Затем клетки трижды промывали фосфатным буферным раствором (ФБР) для удаления не связавшихся антител или ЛПС, после чего клетки фиксировали 0.1% раствором глutarового альдегида в ФБР в течение 30 мин и трижды промывали ФБР.

Для проведения конфокальной и флуоресцентной микроскопии клетки обрабатывали таким же образом, 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 ФИТЦ (Thermo Fisher Scientific, США) в концентрации 1 мкг/мл. В качестве контрольной культуры использовали клетки перевиваемой линии KB, полученной из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН.

Конфокальная и флуоресцентная микроскопия. 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).

Функционализация кантилевера. В работе использовали кантилеверы серии PNP-DB (NanoWorld, Швейцария). Функционализация кантилевера проходила в два этапа: модификация минеральной поверхности аминогруппами и последующая сенсibilизация препаратом ЛПС, который выделяли из культуры вакцинного штамма *Y. pestis* EV, выращенной при температуре 27°C, по Вестфалю [8]. Непосредственно перед проведением модификации кантилеверы облучали ультрафиолетом в течение 15 мин для деконтаминации поверхности и затем помещали в эксикатор, заполненный аргоном. В среду аргона вносили две емкости, содержащие 10 мкл триэтиламина (Reachem, Россия) и 30 мкл (3-аминопропил)триэтоксисилана (APTES) (Sigma-Aldrich, США), и инкубировали при комнатной температуре в течение 1.5 ч. Удаление не связавшихся с минеральной поверхностью кантилевера молекул APTES проводили путем термической обработки при температуре 60°C в течение 1 ч. Сенсibilизацию кантилевера препаратом ЛПС производили с использованием бифункционального полиэтиленгликоля (ПЭГ) по методике, описанной в работе [9]. Модифицированный кантилевер помещали в 0.5 мл хлороформа, содержащего 30 мкл триэтиламина и 1 мг Acetal-PEG-NHS, предоставленного доктором Н. Gruber (Institute for Biophysics, Johannes Kepler University of Linz, Linz, Austria). По истечении 2 ч

инкубирования кантилевер трижды отмывали путем погружения в хлороформ на 5 мин. Кантилевер помещали в свежеприготовленный, профильтрованный через насадку Millipore (0.22 мкм), 1% раствор лимонной кислоты на 10 мин для перевода ацетильной группы ПЭГ в альдегидную с последующей промывкой деионизированной водой (3 раза по 5 мин). Отмытый кантилевер помещали на 1 ч в 100 мкл раствора, содержащего ЛПС в концентрации 50–100 мкг/мл и 20 mM NaCNBH₃ (Sigma-Aldrich, США). Перед проведением данного этапа функционализации препарат липополисахарида центрифугировали (13000 g, 15 мин) для избавления от высокомолекулярных агрегатов и затем фильтровали через насадку Millipore (0.22 мкм). Альдегидные группы, не связавшиеся с ЛПС, блокировали путем добавления 5 мкл 1 М моноэтаноламина в реакционную смесь с последующей инкубацией в течение 10 мин. На завершающем этапе функционализации кантилевер промывали деионизированной водой трижды по 5 мин и осушали с помощью фильтровальной бумаги.

Силовая спектроскопия. Сканирование клеточной поверхности и определение силы межмолекулярного связывания производили с использованием атомно-силового микроскопа Ntegra Prima (NT-MDT, Россия). Перед проведением силовой спектроскопии выбирали клетку, прочно закрепленную на поверхности покровного стекла. Устанавливали область сканирования 30 × 30 мкм и производили сканирование клеточной поверхности в контактном режиме при частоте развертки 1 Гц. Разрешение полученных изображений 256 × 256 пикселей. Затем изучаемую клетку подводили к зонду кантилевера до момента контакта, после 1-с паузы образец отводили от зонда. Во время данного процесса производилась запись силовой кривой — зависимости сигнала отклонения консоли кантилевера от координаты пьезостоллика с образцом. Определение коэффициента пропорциональности между сигналом фотодетектора и отклонением кантилевера для преобразования сигнала фотодетектора в значения силы производили с использованием калибровочных силовых кривых подведения чистого стекла к кантилеверу. Пример хронограмм сигнала отведения клетки от зонда в координатах “сила–расстояние” приведен на рис. 1. Последующая обработка полученных силовых кривых позволяет извлекать информацию о силе связывания между сенсibilизированным зондом и клеткой. Сканирование клеток и силовую спектроскопию производили с использованием кантилеверов серии PNP-DB (NanoWorld, Швейцария) с радиусом закругления иглы 10 нм и жесткостью консоли 0.06 нН/нм. Скорость нагружения межмолекулярной связи 60 нН/с. Все исследования с использо-

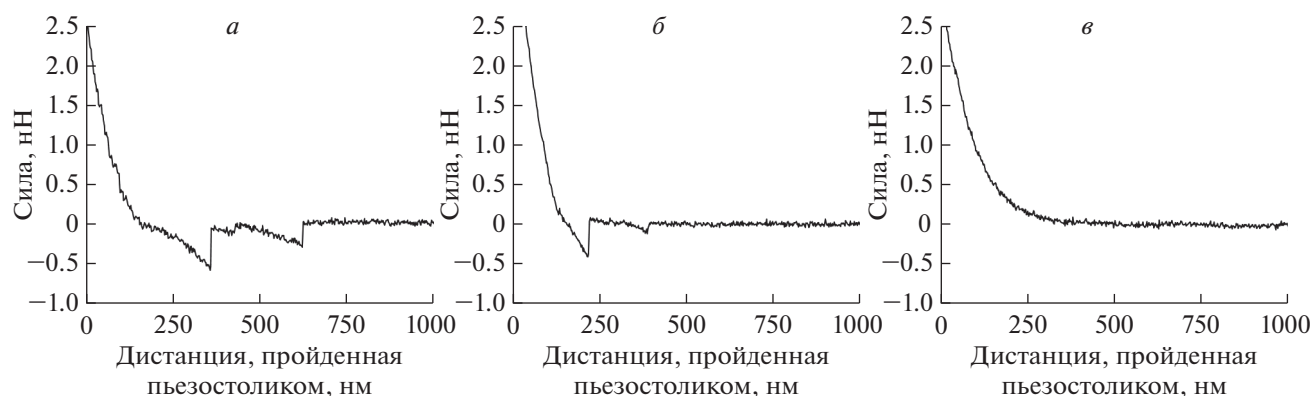


Рис. 1. Пример силовых кривых взаимодействия ЛПС-кантилевера с поверхностью интактной клетки J774 (а) и поверхностью клетки J774, обработанной моноклональными антителами к рецептору TLR4 (б), а также силовой кривой, описывающей отсутствие взаимодействия (в).

ванием атомно-силового микроскопа были выполнены в ФБР.

Статистическая обработка данных. Выбравку силовых кривых и определение силовых характеристик взаимодействия производили с использованием разработанного авторами программного обеспечения. Расчет средних значений, доверительных интервалов и достоверности различий производили с использованием программных пакетов LibreOffice Calc 6.1.5 (The Document Foundation) и Microsoft Excel 2013 (Microsoft).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Считается, что фиксация и дегидратация образцов клеток для исследования с помощью АСМ значительно менее деструктивны, чем пробоподготовка образцов для трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии [10]. Согласно литературным данным [11], ранее уже был использован “мягкий метод” фиксации клеток глутаровым альдегидом (0.5% в течение 60 мин), который может повысить визуализацию клеточных структур и приводит примерно к трехкратному увеличению модуля упругости исследованных клеток RDX2C2.

В предварительных исследованиях мы оценивали условия иммобилизации макрофагов на поверхности стекла, позволяющие достаточно надежно и вместе с тем мягко фиксировать клетки J774 для последующих операций по сканированию ее поверхности и измерению сил связи. Оценку условий фиксации проводили, варьируя концентрацию глутарового альдегида и время экспозиции. В результате этих экспериментов было показано, что для достижения указанной цели оказалась достаточной 30-мин экспозиция покровного стекла в 0.1% растворе глутарового альдегида. Изображение сканированной типичной клетки после такой обработки культуры макрофагов J774 представлено на рис. 2.

Известно, что рецептор TLR4 продуцируется главным образом моноцитами, макрофагами и дендритными клетками, а также некоторыми неиммунными, например эндотелиальными клетками [12]. Рецептор CD14 экспрессируется в связанном с плазматической мембраной виде также большинством клеток миелоидного происхождения [13, 14]. В настоящей работе в качестве объекта исследования была использована культура клеток мышинных макрофагов J774, которые, по данным литературы, экспрессируют рецепторы TLR4 [15] и CD14 [16]. Наличие на поверхности макрофагов рецепторов TLR4 и CD14 подтверждали методом флуоресцентной и конфокальной микроскопии интактных клеток, а также клеток после их обработки конъюгатом на основе моноклональных антител к тому или иному рецептору. Контролем служили клетки эпителия ротовой полости KB, о способности которых экспрессировать указанные рецепторы литературных данных нет.

Как показано на рис. 3, клетки J774, в отличие от клеток KB, характеризуются значительной экспрессией клеточных рецепторов CD14 и TLR4. Это подтверждается также результатами проведенной оценки количественной флуоресценции соответствующих образцов (данные не приведены). Аналогичные данные были получены при исследовании методом конфокальной микроскопии. Так, представленные на рис. 4 микрофотографии клеток, обработанных конъюгатом с FITC моноклональных антител к CD14, свидетельствуют о существенной экспрессии этих рецепторов на поверхности клеток J774, но не KB.

Для проверки специфичности взаимодействия рецепторов CD14 и TLR4 клеток J774 именно с ЛПС *Y. pestis* измерения силы взаимодействия ЛПС с клетками J774 методом атомно-силовой микроскопии проводили также при добавлении в среду ЛПС или моноклональных антител против рецепторов CD14 и TLR4.

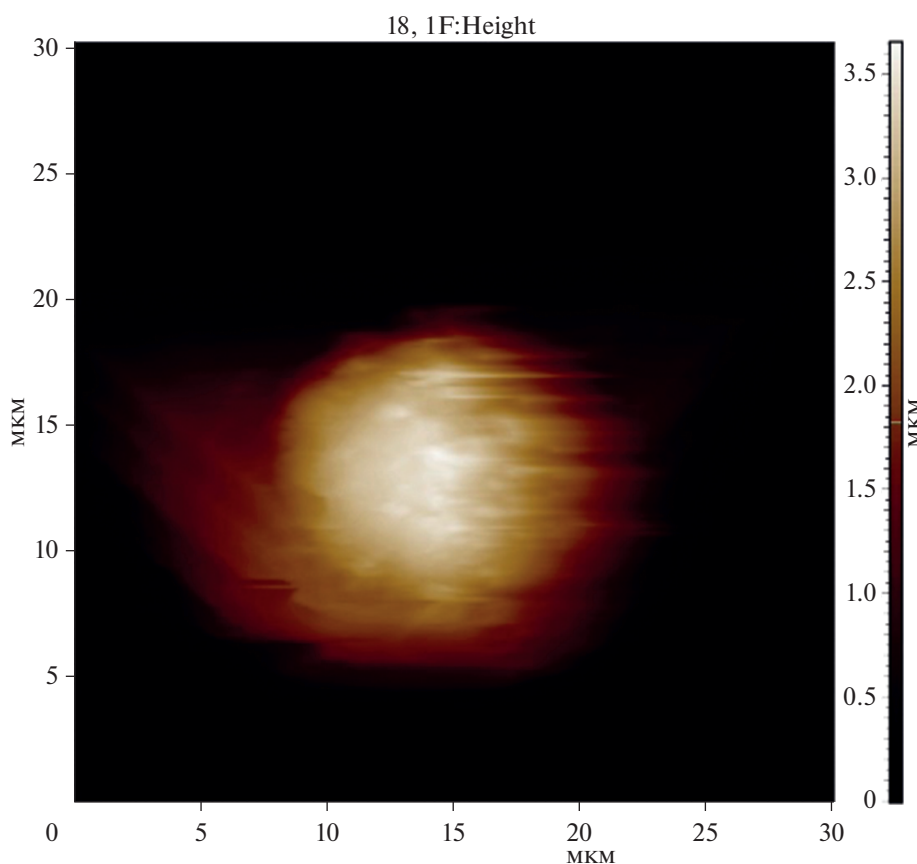


Рис. 2. АСМ-изображение поверхности макрофага J774 после обработки клеток 0.1% глутаровым альдегидом в течение 30 мин. Цветовая шкала отражает высоту объекта.

Оценка силовых характеристик взаимодействия ЛПС с поверхностью иммобилизованных макрофагов J774 методом атомно-силовой микроскопии осуществлялась с использованием следующих критериев оценки регистрируемых хронограмм сигнала фотодетектора: средняя сила разрыва последней связи; работа сил адгезии; средняя сила разрыва всех связей; средняя сила разрыва первой связи; длина ассоциата, под которой понимается расстояние от поверхности клетки до зонда (острия) кантилевера в момент разрыва последней связи; количество разрывов связей на одну силовую кривую; количество силовых кривых, имеющих как минимум один разрыв связей. Как считается, первые три критерия являются наиболее информативными при оценке силовых характеристик связи между молекулами. Разрыв последней связи характеризует межмолекулярное взаимодействие, в котором минимизировано влияние минеральной поверхности зонда или линкера на регистрируемую силу. Работа сил адгезии и средняя сила разрыва всех связей отражают интегральную характеристику взаимодействия и учитывают все образовавшиеся специфические и неспецифические связи. Схема экспериментальной установки, подробное описание методик выбра-

ковки хронограмм и обработки силовых кривых, а также описание критериев оценки силовых характеристик для системы взаимодействующих молекул приведены в работе [17]. Ключевым отличием процедуры выбраковки силовых кривых, полученных при работе с клетками, является отсутствие требования к линейности силовой кривой на участке от начала отведения до момента пересечения базисной линии, по которому определяется коэффициент пропорциональности β между сигналом фотодетектора и отклонением кантилевера. Это обусловлено сложностью поверхности клеток и их реологическими свойствами, что может приводить к значительному числу артефактов и нелинейности хронограммы сигнала на начальном этапе отведения. В этой связи для определения коэффициента пропорциональности использовали калибровочные силовые кривые взаимодействия кантилевера с чистым стеклом. В работе [17] было показано, что определенные силы чисто специфического взаимодействия даже на примере относительно простой системы “антиген–антитело” является трудновыполнимой задачей вследствие большого вклада неспецифического компонента в регистрируемое взаимодействие. Следует отметить, что взаимодействие

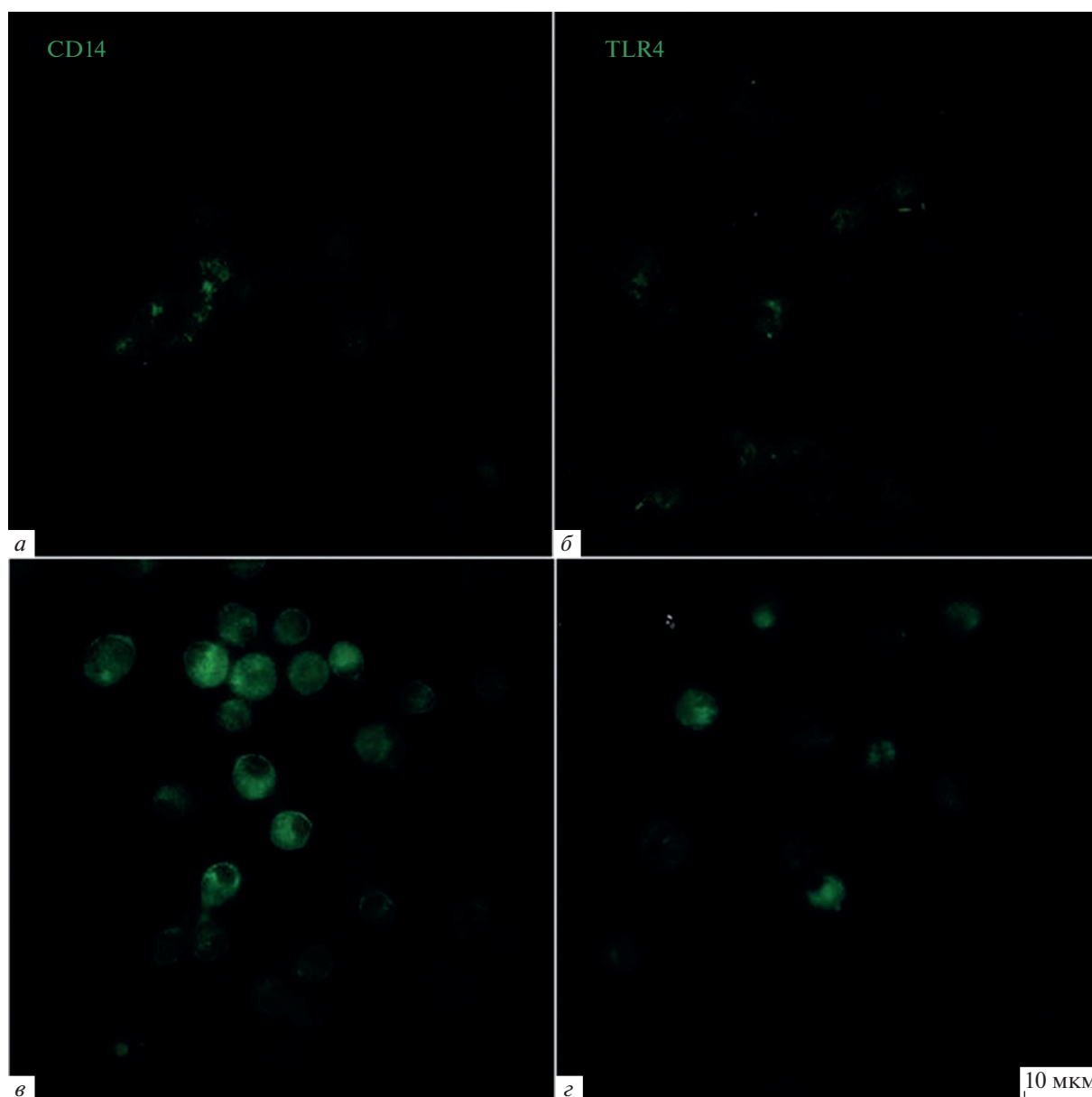


Рис. 3. Визуализация клеток KB (*а, б*) и J774 (*в, з*), обработанных моноклональными антителами к CD14 (*а, в*) и TLR4 (*б, з*), с помощью флуоресцентной микроскопии.

липополисахарида с клеточной поверхностью является более сложным, комплексным в сравнении с межмолекулярным взаимодействием “ЛПС—антитела”, описанным в статье [17], что отражается в усложнении сигнала, регистрируемого на силовой кривой.

Как известно, сила межмолекулярных связей в системах “антиген—антитело”, оцениваемая биофизическими методами, не превышает нескольких сотен пиконьютон [18]. В ходе проведения экспериментов были получены в том числе и значения силы взаимодействия в несколько наноньютон. Это, очевидно, объясняется множественностью формируемых связей между поверх-

ностью клетки и липополисахаридом, иммобилизованным 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. [19–21]. Даже центрифугирование и микрофильтрация препарата ЛПС, проведенные непосредственно перед процедурой сенсibilизации кантилевера, не исключают присутствия в растворе относительно крупномолекулярных агрегатов ЛПС. Регист-

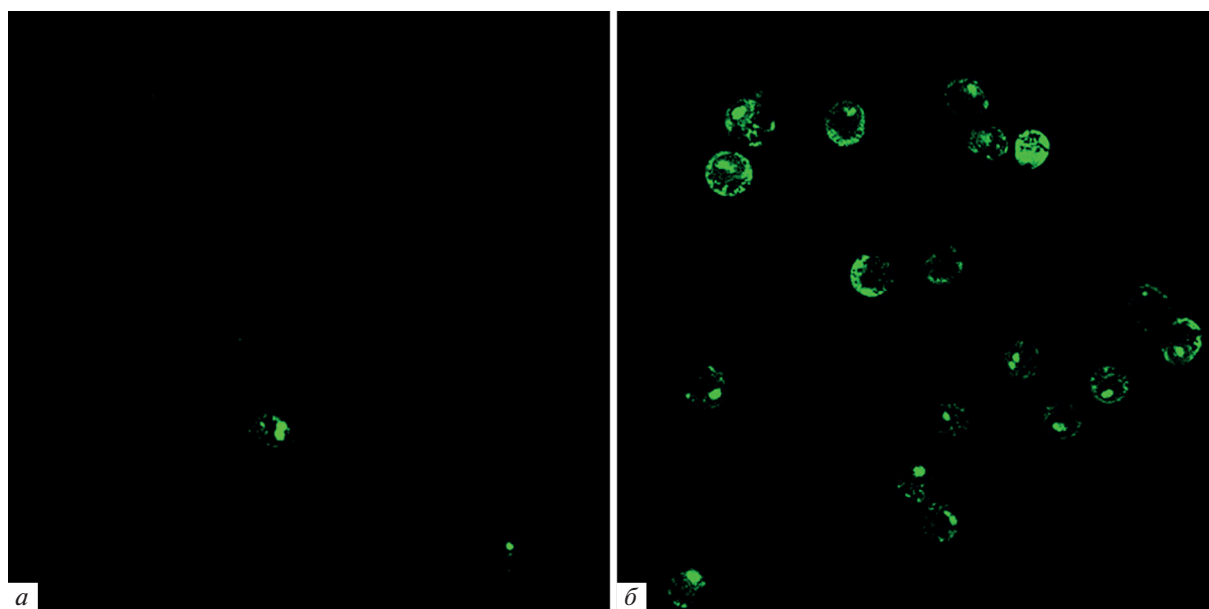


Рис. 4. Визуализация клеток KB (а) и J774 (б), обработанных моноклональными антителами к CD14, с помощью конфокальной микроскопии. Масштаб изображений тот же, что и на рис. 3.

страция 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 агрегатов ЛПС. Неспецифическое связывание может определяться также вполне вероятным взаимодействием гидрофобного 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 аминогрупп APTEs на зонде и альдегидных групп глутарового альдегида на поверхности макрофага может вносить значительный вклад в регистрируемые силы связи. Чтобы минимизировать вклад неспецифических связей и, предположительно, множественных специфических связей ЛПС с рецепторами макрофага, силовые кривые, содержащие силы отрыва выше 1 нН, были исключены из числа подлежащих статистической обработке с помощью специально разработанной авторами программы. Данные после указанной выбраковки представлены в табл. 1.

Блокировка рецепторов TLR4 на поверхности иммобилизованных клеток J774 специфическими моноклональными антителами привела к суще-

ственному ($p < 0.01$) снижению значений силовых характеристик, в частности силы первого и последнего отрывов, средней силы всех отрывов, а также работы сил адгезии, в сравнении с интактными клетками. В целом, аналогичное, но немногим менее выраженное ослабление сил связи по оцениваемым параметрам зарегистрировано для клеток J774 с заблокированным моноклональными антителами рецептором CD14, за исключением амплитуды первого и последнего отрывов. Для указанных параметров различия между заблокированными и интактными клетками достоверны с меньшей и приблизительно одинаковой вероятностью ($p \sim 0.05$). Роль рецепторов в связывании липополисахарида косвенно подтверждается их блокировкой препаратом ЛПС *Y. pestis* EV. Эти результаты согласуются с ранее опубликованными данными [6], свидетельствующими о способности ЛПС взаимодействовать с рецептором TLR4 в составе плазматической мембраны макрофагов без предварительного связывания с рецептором CD14. Представленные в табл. 1 данные указывают на то, что взаимодействие ЛПС *Y. pestis* с рецептором CD14 может происходить и без участия липополисахарид-связывающего белка. Вполне вероятно также, что водорастворимый ЛПС может связываться с рецептором CD209b макрофагов линии J774 и рецептором CD207 клеток Лангерганса, препятствуя взаимодействию с ним ЛПС, иммобилизованного на зонде, что, в целом, приводит к снижению силовых характеристик. Такое предположение согласуется с данными К. Yang и соавт., показавших, что чумной микроб за счет коровой области ЛПС может связываться с этими рецепторами у антигенпрезен-

Таблица 1. Силовые характеристики взаимодействия ЛПС с поверхностью клеток J774

Показатель	Значение показателя ($X_{\text{mean}} \pm I_{99}$) для клеток			
	J774 (контроль, не обработаны)	J774 + anti-TLR4	J774 + anti-CD14	J774 + ЛПС
Сила последнего отрыва, нН	0.216 ± 0.031	0.164 ± 0.029	0.183 ± 0.033	0.189 ± 0.043
Работа сил адгезии, Дж × 10 ⁻¹⁵	0.31 ± 0.06	0.20 ± 0.06	0.19 ± 0.05	0.17 ± 0.07
Средняя сила всех отрывов, нН	0.253 ± 0.020	0.190 ± 0.020	0.210 ± 0.018	0.187 ± 0.029
Сила первого отрыва, нН	0.254 ± 0.033	0.203 ± 0.031	0.218 ± 0.031	0.201 ± 0.041
Длина ассоциата, нм	396.5 ± 61.6	486.8 ± 83.0	425.1 ± 72.0	428.5 ± 95.9
Количество отрывов	2.13 ± 0.20	2.06 ± 0.27	2.14 ± 0.19	1.67 ± 0.25
Количество отведений с отрывами, %	57.0	47.9	44.2	31.1
Количество опытов	325	277	282	183

тирующих клеток [7, 22]. Следует отметить, что каждый из трех вариантов блокировки (с помощью ЛПС или моноклональных антител к CD14 и TLR4) снижает вероятность связывания липополисахарида, иммобилизованного на кантелевере, с клеточной поверхностью, на что указывает сокращение “количества отведений с отрывами” (табл. 1).

Таким образом, в ходе проведенных исследований методом атомно-силовой микроскопии с использованием комплементарных моноклональных антител к рецепторам CD14 и TLR4 показано взаимодействие липополисахарида *Y. pestis* с рецепторами CD14 и TLR4 на поверхности макрофагов J774. Разработанная экспериментальная модель может использоваться в дальнейшем для исследований эффективности препаратов, модулирующих взаимодействие липополисахарида *Y. pestis* с рецепторами CD14 и TLR4 и влияющих на эффективность заражения клеток патогеном.

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (исследования по конфокальной и флуоресцентной микроскопии выполнены за счет средств проекта № 21-74-10034) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-34-90013).

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Книрель Ю.А., Анисимов А.П. 2012. Липополисахарид чумного микроба *Yersinia pestis*: структура, генетика, биологические свойства. *Acta Naturae*. **4** (3), 49–61.
- Leo J.C., Skurnik M. 2011. Adhesins of human pathogens from the genus *Yersinia*. *Adv. Exp. Med. Biol.* **715**, 1–15.
- Коньшев И.В., Иванов С.А., Копылов П.Х., Анисимов А.П., Дентовская С.В., Бывалов А.А. 2022. Роль антигенов *Yersinia pestis* в адгезии к макрофагам J774. *Прикладная биохимия и микробиология*. **58** (4), 352–359.
- Park B.S., Lee J.O. 2013. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp. Mol. Med.* **45** (12), e66.
- Kim S.J., Kim H.M. 2017. Dynamic lipopolysaccharide transfer cascade to TLR4/MD2 complex via LBP and CD14. *BMB Rep.* **50** (2), 55–57.
- Matsuura M., Takahashi H., Watanabe H., Saito S., Kawahara K. 2010. Immunomodulatory effects of *Yersinia pestis* lipopolysaccharides on human macrophages. *Clin. Vaccine Immunol.* **17** (1), 49–55.
- Yang K., He Y., Park C.G., Kang Y.S., Zhang P., Han Y., Cui Y., Bulgheresi S., Anisimov A.P., Dentsovskaya S.V., Ying X., Jiang L., Ding H., Njiri O.A., Zhang S., Zheng G., Xia L., Kan B., Wang X., Jing H., Yan M., Li W., Wang Y., Xiamu X., Chen G., Ma D., Bartra S.S., Plano G.V., Klena J.D., Yang R., Skurnik M., Chen T. 2019. *Yersinia pestis* interacts with SIGNR1 (CD209b) for promoting host dissemination and infection. *Front Immunol.* **10**, 96.
- Westphal O., Jann K. 1965. Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenolwater and further applications of the procedure. *Methodes Carbohydr. Chem.* **5**, 83–91.
- Ebner A., Wildling L., Gruber H.J. 2019. Functionalization of AFM tips and supports for molecular recognition force spectroscopy and recognition imaging. *Methods Mol. Biol.* **1886**, 117–151.
- Pi J., Cai J. 2019. Cell topography and its quantitative imaging by AFM. In: *Atomic Force Microscopy: Methods and Protocols*. Eds Santos N.C., Carvalho F.A. New York: Humana New York, p. 99–113.
- Hutter J.L., Chen J., Wan W.K., Uniyal S., Leabu M., Chan B.M.C. 2005. Atomic force microscopy investigation of the dependence of cellular elastic moduli on glutaraldehyde fixation. *J. Microscopy*. **219** (2), 61–68.
- Vaure C., Liu Y. 2014. A comparative review of Toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Front Immunol.* **5**, 316.
- Mahnke K., Becher E., Ricciardi-Castagnoli P., Luger T.A., Schwarz T., Grabbe S. 1997. CD14 is expressed by subsets of murine dendritic cells and upreg-

- ulated by lipopolysaccharide. *Adv. Exp. Med. Biol.* **417**, 145–159.
14. Sabroe I., Jones E.C., Usher L.R., Whyte M.K.B., Dower S.K. 2002. Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: A critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *J. Immunol.* **168**, 4701–4710.
 15. Choi S.-H., Harkewicz R., Lee J.H., Boullier A., Almazan F., Li A.C., Witztum J.L., Bae Y.S., Miller Y.I. 2009. Lipoprotein accumulation in macrophages via TLR4-dependent fluid phase uptake. *Circ. Res.* **104** (12), 1355–1363.
 16. Wei M.-T., Hua K.-F., Hsu J., Karmenyan A., Tseng K.-Y., Wong C.-H., Hsu H.-Y., Chiou A. 2007. The interaction of lipopolysaccharide with membrane receptors on macrophages pretreated with extract of Reishi polysaccharides measured by optical tweezers. *Optics Express*. **15**, 11020–11032.
 17. Бывалов А.А., Белозёров В.С., Ананченко Б.А., Конышев И.В. 2022. Специфические и неспецифические взаимодействия липополисахарида *Yersinia pseudotuberculosis* с моноклональными антителами, охарактеризованные методом атомно-силовой микроскопии. *Биофизика*. **67** (6), 1056–1067.
 18. Arnal L., Longo G., Stupar P., Castez M.F., Cattelan N., Salvarezza R.C., Yantorno O.M., Kasas S., Vela M.E. 2015. Localization of adhesins on the surface of a pathogenic bacterial envelope through atomic force microscopy. *Nanoscale*. **7** (41), 17563–17572.
 19. Richter W., Vogel V., Howe J., Steiniger F., Brauser F., Koch M.H.J., Roessle M., Gutschmann T., Garidel P., Mäntele W., Brandenburg K. 2010. Morphology, size distribution, and aggregate structure of lipopolysaccharide and lipid A dispersions from enterobacterial origin. *Innate Immunity*. **17** (5), 1–12.
 20. Bergstrand A., Svanberg C., Langton M., Nyden M. 2006. Aggregation behavior and size of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* O55:B5. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. **53** (1), 9–14.
 21. Santos N.C., Silva A.C., Castanho M.A., Martins-Silva J., Saldanha C. 2003. Evaluation of lipopolysaccharide aggregation by light scattering spectroscopy. *Chembiochem*. **4** (1), 96–100.
 22. Yang K., Park C.G., Cheong C., Bulgheresi S., Zhang S., Zhang P., He Y., Jiang L., Huang H., Ding H., Wu Y., Wang S., Zhang L., Li A., Xia L., Bartra S.S., Plano G.V., Skurnik M., Klena J.D., Chen T. 2015. Host Langerin (CD207) is a receptor for *Yersinia pestis* phagocytosis and promotes dissemination. *Immunol. Cell Biol.* **93** (9), 815–824.

Force Characteristics of *Yersinia pestis* Lipopolysaccharide Interaction with TLR4 and CD14 Receptors on J774 Macrophages. Atomic Force Microscopy

V. S. Belozherov^{1, 2}, B. A. Ananchenko¹, I. V. Konyshev^{1, 2}, L. G. Dudina^{1, 2},
S. A. Konnova³, E. V. Rozhina³, R. F. Fakhrullin³, A. A. Byvalov^{1, 2, *}

¹Vyatka State University, Kirov, 610000 Russia

²Institute of Physiology, Komi Science Centre, Urals Branch of Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Komi Republic, 167982 Russia

³Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Privolzhsky) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, 420008 Russia

*e-mail: byvalov@nextmail.ru

One of the main stages of infectious process, which mostly determines the course and outcome of the disease, is the initial contact of the pathogen with the host cells. The lipopolysaccharide as a component of the outer membrane is crucially involved in the interaction between Gram-negative bacteria and immunocompetent host cells. It triggers immune reactions by interaction with specific receptors, mainly CD14 and TLR4. The aim of this work was to quantify the force characteristics of the interaction of *Yersinia pestis* EV lipopolysaccharide with CD14 and TLR4 receptors on the surface of mouse macrophages J774 by atomic force microscopy. Lipopolysaccharide was extracted from *Y. pestis* cells (vaccine strain EV) grown at 27°C. The expression of receptors on the cell surface was evaluated by fluorescent and confocal microscopy. Using monoclonal antibodies against CD14 and TLR4 receptors, force spectroscopy was used to estimate the force characteristics of the interaction between lipopolysaccharide on the cantilever surface and J774 macrophages immobilized on a glass substrate. The conditions for immobilization of J774 macrophages on glass were developed that allowed scanning the cell surface and estimating the adhesion force of target antigens to the cells. Incubation of macrophages in solutions with monoclonal antibodies against CD14 and TLR4 receptors caused a decrease in the major force characteristics of the interaction in the J774 macrophage – *Y. pestis* lipopolysaccharide system compared to the system containing untreated macrophages. A similar effect was observed after pretreatment of the cells with a solution containing the same lipopolysaccharide without monoclonal antibodies. The results show the ability of the *Y. pestis* lipopolysaccharide chemically bound to the cantilever to interact with CD14 and TLR4 receptors on the macrophage surface.

Keywords: *Yersinia pestis*, lipopolysaccharide, receptor, CD14, TLR4, macrophages J774, atomic force microscopy