

УДК 579.61,571.27

РОЛЬ АНТИГЕНОВ *Yersinia pestis* В АДГЕЗИИ К МАКРОФАГАМ J774, ОЦЕНЕННАЯ МЕТОДОМ ОПТИЧЕСКОЙ ЛОВУШКИ

© 2022 г. И. В. Конышев^{1, 2}, С. А. Иванов³, П. Х. Копылов³, А. П. Анисимов³, С. В. Дентовская^{3, **}, А. А. Бывалов^{1, 2, *}

¹Вятский государственный университет, Киров, 610000 Россия

²Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, 167982 Россия

³Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, р.п. Оболensk, Серпухов, Московская обл., 142279 Россия

*e-mail: byvalov@nextmail.ru

**e-mail: info@obolensk.org

Поступила в редакцию 12.10.2021 г.

После доработки 15.12.2021 г.

Принята к публикации 28.02.2022 г.

Проведена оценка роли поверхностных антигенов в адгезии *Yersinia pestis* к мышинным макрофагам J774. С помощью методов оптической ловушки и/ или пассивной адгезии подтверждена способность антигенов Ail и Psa адгезировать к эукариотическим клеткам. Впервые показано, что ауто-транспортер YарF является адгезином чумного микроба. Высказано предположение, что указанные антигены не имеют комплементарных рецепторов на поверхности макрофага и их адгезивность носит неспецифический характер. Результаты оценки пассивной адгезии к макрофагам J774 полистироловых микросфер, сенсibilизированных капсульным антигеном F1, позволили предположить, что действие этого антигена в составе микробной клетки, ингибирующее адгезию к макрофагам, определяется не только пространственным экранированием капсулой глубже расположенных адгезинов, но и физико-химическими свойствами этого антигена.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, макрофаг, адгезия, антиген, оптическая ловушка

DOI: 10.31857/S055510922040080

Начальный этап инфицирования макроорганизма, как правило, определяется адгезией патогенных бактерий к эпителию желудочно-кишечного тракта, респираторной или мочеполовой систем. Чумной микроб *Yersinia pestis* может проникать в организм млекопитающего не только в составе вдыхаемого аэрозоля, но и чрескожно в результате укуса инфицированным переносчиком. В последнем случае возбудитель чумы с током крови быстро достигает многих органов и тканей, вступая в контакт с клетками хозяина, включая, помимо профессиональных фагоцитов, эпителиальные, эндотелиальные клетки и фибробласты [1]. Исход такого взаимодействия во многом зависит от оснащённости бактерий адгезинами – специальными поверхностными структурами, способствующими прикреплению микробов к клеткам макроорганизма с последующей их инвазией. Чумной микроб располагает целым набором адгезинов, наличие или степень выраженности которых на наружной мембране зависит от окружающих условий. К числу таких молекул относят прежде всего белки Ail, Pla и Psa *Y. pestis*.

Родоспецифический белок Ail, кодируемый геном с хромосомной локализацией, имеет у различных видов и штаммов иерсиний незначительные отличия по аминокислотному составу, участвует в обеспечении устойчивости бактерий к комплементу сыворотки крови, их адгезии и инвазии в клетки хозяина [2–4]. Опосредуемая белком Ail адгезия чумного микроба к эукариотической клетке осуществляется путем связывания с компонентами внеклеточного матрикса – ламинином, фибронектином, гепарансульфат-протеогликаном. Это способствует, в частности, доставке в целевые клетки Yops-эффекторных белков наружной мембраны, кодируемых плазмидой кальций-зависимости иерсиний и участвующих в формировании их патогенетического потенциала [5].

Белок Pla (активатор плазминогена), являясь адгезином и протеазой, способствует связыванию возбудителя чумы с белками внеклеточного матрикса [6, 7] с последующей инвазией микроба в эукариотические клетки [8].

Psa (pH6-антиген) экспрессируется преимущественно при слабых кислотных pH, соответствующих

внутриклеточному содержимому. Он может связываться с галактозилными остатками гликофинголипидов и фосфатидилхолина на поверхности клеток хозяина, проявляя выраженные свойства адгезина [9]. Есть данные, указывающие на то, что Psa способствует адгезии бактерий *Y. pestis* к эпителиальным клеткам респираторного тракта, но препятствует их инвазии [10]. В то же время, показано, что способность к экспрессии Psa не повышает адгезию клеток возбудителя чумы к мышинным макрофагам RAW264.7 и участие в доставке Yops, но придает микробу резистентность к фагоцитозу [11].

Высокая степень структурной гомологии капсального антигена F1 *Y. pestis* и человеческого интерлейкина 1b, а также их высокое родство к соответствующим рецепторам на поверхности мышинных фибробластов (линии NIH 3T3) позволило авторам цитируемой работы предположить, что F1 может участвовать в адгезии *Y. pestis* к иммунокомпетентным клеткам хозяина [12]. Позднее было показано, что F1, напротив, ингибирует бактериальную адгезию, по-видимому, путем экранирования адгезинов на поверхности микроба, тем самым предотвращая фагоцитоз, ослабляя взаимодействие с фагоцитами [10, 13, 14].

“Мышиный” токсин (Ymt) не рассматривается в качестве адгезина *Y. pestis*. Вместе с тем, поверхностная локализация белка [15] и доказанная роль в образовании блока в преджелудке блохи [16], процессе, при котором значима адгезивность бактериальных клеток, не исключают вероятности участия этого антигена в непосредственном взаимодействии патогена со структурами и теплокровного хозяина.

Показана значимость ряда поверхностно расположенных аутопереносчиков V_a-типа (около 10) во взаимодействии бактерий *Y. pestis* с клетками хозяина, однако механизм участия этих белков в чумной инфекции, в частности, в адгезии к клеткам млекопитающих, изучен недостаточно [17, 18].

Установлено, что клетки *Y. pestis* используют коровую область липополисахарида для адгезии к антигенпрезентирующим клеткам посредством взаимодействия с SIGNR1 (CD209b) – рецептором для последующей диссеминации в лимфатические узлы, селезенку, печень хозяина, инициируя системную инфекцию [19].

По-видимому, во всяком случае формально, к числу адгезинов можно отнести V-антиген *Y. pestis*, один из белков системы секреции 3 типа T3SS, который вступает в непосредственный контакт с клеткой макроорганизма. Установлен рецептор на поверхности иммунокомпетентных клеток человека – N-формилпептид (FPR1), с которым связывается V-антиген, инициирующий транслокацию эффекторных белков микроба в эукариотическую клетку [20]. Участниками этого процес-

са являются и другие адгезины возбудителя, в частности, белок Ail [5]. Очевидно, что процесс взаимодействия микробной клетки с клеткой хозяина в условиях *in vitro*, и тем более *in vivo*, не может быть описан какой-то одной схемой, так как зависит от типа и особенностей взаимодействующих клеток, а также разнообразия внешних условий. Предполагается, что могут быть идентифицированы и иные, в настоящее время неизвестные механизмы адгезии клеток иерсиний к клеткам макроорганизма [21, 22].

До настоящего времени связь вышеуказанных поверхностных антигенов с адгезивностью чумного микроба к эукариотическим клеткам оценивалась с помощью молекулярно-генетических, микробиологических, а также *in silico* методов.

Цель настоящей работы – изучение адгезивных свойств ряда поверхностных антигенов *Y. pestis* к макрофагам J774 с использованием методов оптической ловушки и пассивной адгезии.

МЕТОДИКА

Эукариотические клетки. Культура клеток макрофагов мыши линии J774 получена из Российской коллекции клеточных культур позвоночных (Институт цитологии РАН, Россия). Пересевы клеток проводились в питательной среде RPMI-1640, содержащей L-глутамин с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (“Биолот”, Россия) в CO₂-инкубаторе (5% CO₂) при температуре 37°C.

Выделение и очистка антигенов. F1-антиген выделяли из супернатанта культуры *Y. pseudotuberculosis* 11M/pFSK3-9 (Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур “ГКПМ-Оболensk”) методом осаждения в изоэлектрической точке 4.1 раствором (NH₄)₂SO₄ (30%) и последовательной гель-фильтрацией [23]. рН6-антиген получали из супернатанта культуры *E. coli* DH5α/pIG824 (ГПКМ-Оболensk) методом осаждения 30%-ным раствором (NH₄)₂SO₄ [24]. Белок Ymt выделяли из экстракта клеток штамма *Y. pestis* subsp. *pestis* EV (ГПКМ-Оболensk) фракционированием (NH₄)₂SO₄ с последующей очисткой колоночной хроматографией на сефадексе G-100.

Кодирующую последовательность генов *yapF*, *yapL*, *yapM* и *ail* из штамма *Y. pestis* subsp. *pestis* EV НИИЭГ клонировали в составе векторной плазмиды pET32b(+) по сайтам рестриктаз NdeI и XhoI в клетках протеазодефицитного штамма *E. coli* BL21(DE3) (“Novagen”, США). Эти рекомбинантные белки (YapF, YapL, YapM и Ail) выделяли методом металло-хелатной хроматографии. Все этапы очистки белков YapF, YapM, YapL и Ail, содержащих His₆, выполняли на хроматографической колонке XK-26 (GE Healthcare Biosciences), упакованной 25 мл Ni⁺⁺-TSK gel AF-Chelate TOYOPEARL 650M (“Tosoh Bioscience”, США) в соответствии с

рекомендуемым протоколом производителя в условиях денатурации 6 М мочевиной. Фракции, содержащие белки в максимальной концентрации, анализировали методом электрофореза в ПААГ с ДДС-Na и диализировали против буфера, содержащего 20 мМ Трис-HCl, 150 мМ NaCl, 0.2 мМ ЭДТА, pH 7.4, для хранения.

Получение антисывороток. Антисыворотки к использованному в работе белкам получали путем иммунизации беспородных белых мышей обоего пола массой 18–20 г. Сорбируемые на геле гидрокси алюминия антигены в дозе 10 мкг вводили животным подкожно в область бедра двукратно с интервалом в 30 дней. Через 30 дней после бустерной иммунизации получали кровь путем пункции ретроорбитального синуса.

Сенсибилизация микросфер антигенами. В работе использовали полистироловые микросферы диаметром 1 мкм (“Polysciences”, США). К 280 мкл антигенов YарM, YарF, YарL, Psa, F1, Ymt (0.3 мг/мл) в фосфатном буферном растворе (ФБР) добавляли 40 мкл 2.5%-ной (вес/об.) суспензии микросфер. После инкубирования на термошейкере при температуре 37°C (250 об./мин) в течение 1 ч суспензию выдерживали в течение 18–20 ч при 4–6°C, центрифугировали (13000 g, 15 мин), осадок ресуспендировали в блокирующем буфере 1%-ного бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 0.05%-ного твин-20. Суспензию инкубировали на термошейкере 1 ч при температуре 37°C (250 об./мин), трижды отмывали ФБР. После заключительного центрифугирования осадок ресуспендировали в ФБР до конечной концентрации микросфер 0.5% (вес/об.). В идентичных условиях параллельно готовили суспензию контрольных микросфер, сенсибилизированных 1%-ным БСА.

Препарат белка Ail солибилизировали в течение 10 мин в буфере TES (100 мМ Трис-HCl, pH 7.5, 1% ДДС-Na, 5 мМ ЭДТА) в объемном соотношении антиген – буфер 4 : 1 и затем диализовали против карбонат-бикарбонатного буфера, pH 9.5, непосредственно перед добавлением суспензии микросфер. Далее раствор белка Ail в концентрации 0.3 мг/мл использовался для приготовления сенсибилизированных микросфер по вышеописанной схеме.

Для подтверждения факта сенсибилизации микросфер тем или иным антигеном использовали метод истощения комплементарной поликлональной сыворотки путем инкубирования в ней сенсибилизированных микросфер. Для этого к той или иной антисыворотке, предварительно разведенной до нужной концентрации, добавляли суспензию соответствующих микросфер в объемном соотношении 10 : 1. После инкубации в течение 2 ч при температуре 37°C суспензию центрифугировали. Убыль иммунохимической активности получен-

ной надосадочной жидкости по сравнению с сывороткой, инкубированной с микросферами, нагруженными БСА, и этой сывороткой до инкубации свидетельствовала о том, что целевой антиген связан с поверхностью микросфер. Активность истощенных и интактных мышинных сывороток к целевым антигенам, за исключением F1, оценивали стандартным методом иммуноферментного анализа (ТИФА), покрывая дно лунок планшета антигенами в концентрации 10 мкг/мл, с последующим добавлением жидкостей, содержащих антитела к тому или иному антигену, козьего антимышиного конъюгата, *o*-фенилендиамина в качестве субстрата. Интенсивность иммуноферментной реакции выражали в значениях ОП₄₉₂. Для верификации сенсибилизации микросфер антигеном F1 использовали реакцию непрямого геммагглютинации (РНГА) с комплектом диагностикума чумного антигенного эритроцитарного производства Научно-исследовательского института микробиологии МО РФ (Россия), включающего антисыворотку к F1. Результаты выражали в титре антител.

Определение силы взаимодействия между микросферой и макрофагом методом оптической ловушки. Подробное описание процедуры определения силы отрыва сенсибилизированной микросферы от иммобилизованной клетки приведено ранее [25]. Измерения проводили с использованием лазерного нанопинцета Nano-Tracker™ (“JPK Instruments AG”, Германия) со встроенным инвертированным микроскопом Nikon Eclipse (“Nikon”, Нидерланды) с объективом 60×, NA = 1.2 и лазером с длиной волны 1064 нм для формирования оптической ловушки и регистрации смещений захваченной микросферы.

На чашку “Fluorodish” диаметром 35 мм (“WPI”, USA) с 2 мл среды RPMI-1640, содержащей гентамицин (100 мкг/мл), высевали клетки до конечной концентрации $(10-30) \times 10^3$ кл./мл, инкубировали в CO₂-инкубаторе (5% CO₂) при 37°C в течение 18 ч. Чашку помещали на термостатируемый пьезосталик нанопинцета и после отмывки ФБР иммобилизованных клеток в нее добавляли суспензию микросфер. После калибровки прибора лазерным лучом захватывали микросферу и к ней пошагово (шаг по 50 нм) по оси “OX” подводили чашку с выбранной клеткой до момента их контакта. Через 0.8–1.0 с после остановки чашку отводили с постоянной скоростью 100 нм/с. О факте разрыва связи между микросферой и клеткой судили по появлению на начальном линейном участке отведения скачкообразной инверсии хронограммы сигнала фотодетектора до базисной линии. Сила разрываемой связи соответствовала амплитуде такого скачка сигнала [25].

Схема проведения экспериментов по измерению силы взаимодействия сенсибилизированной

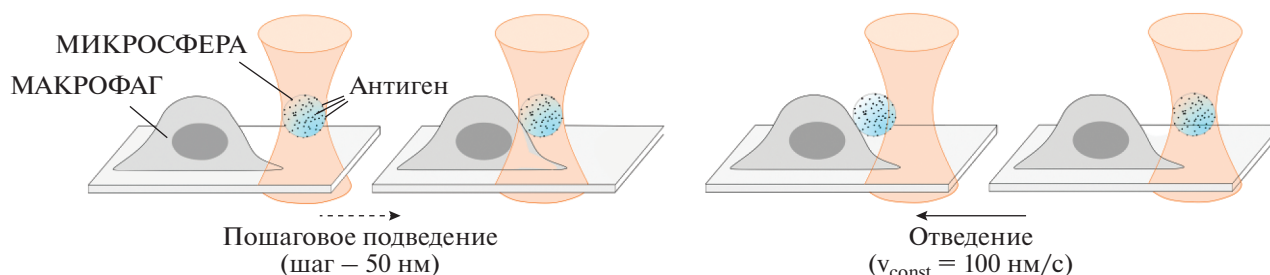


Рис. 1. Схематическое изображение стадий определения силы связи методом оптической ловушки в модельной системе “сенсibilизированная микросфера – макрофаг J774”.

антигеном микросферы и клеткой J774 представлена на рис. 1.

Определение пассивной адгезии микросфер к макрофагам. В работе использовали полистироловые микросферы диаметром 2 мкм (“Polysciences”, США), которые сенсibilизировали целевыми антигенами по вышеописанной методике. Макрофаги J774 высевали на чашки “Fluorodish” диаметром 35 мм (“WPI”, USA) с 2 мл среды RPMI-1640, содержащей гентамицин (100 мкг/мл), до концентрации 50×10^3 кл./мл ($\approx 100 \times 10^3$ кл. на чашку), термостатировали в CO_2 -инкубаторе (5% CO_2) при 37°C в течение 18 ч. После этого содержимое чашек удаляли, дважды промывали их чистой бессывороточной средой и вносили суспензию тех или иных микросфер, предварительно разведённую в 2 мл среды RPMI-1640 до получения расчетной концентрации 2.84×10^6 мл⁻¹ (соотношение микросфер и клеток – 57 : 1). После 20 и 60 мин инкубации при температуре 37°C чашки трехкратно отмывали ФБР, вносили глутаровый альдегид до конечной концентрации 2.5% на 30 мин, после отмывки вносили 2 мл ФБР и с помощью микроскопа Nikon Eclipse (“Nikon”, Нидерланды) с объективом 60×, NA = 1.2, встроенного в лазерный нано-

пинцет NanoTracker™ (“JPK Instruments AG”, Германия), подсчитывали количество микросфер, расположенных в проекции случайно выбранной клетки макрофага. Учитывая определенную субъективность учета таких результатов, микроскопию всех препаратов проводил один оператор в слепых опытах с зашифрованными чашками, используя в каждом из них снимки не менее 15 полей зрения. Результаты выражали в средних значениях числа микросфер, приходящихся на одну клетку.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты, представленные в табл. 1, свидетельствовали о том, что использованные в работе антигены *Y. pestis* связаны с поверхностью полистирола микросфер.

Как видно из табл. 2, из числа использованных антигенов *Y. pestis* лишь белок Ail проявлял выраженные адгезивные свойства: среднее значение силы отрыва сенсibilизированной этим белком микросферы от иммобилизованного макрофага оказалось существенно более высоким по сравнению с контрольными микросферами, покрытыми БСА ($p < 0.01$).

Таблица 1. Результаты иммунохимической верификации факта сенсibilизации микросфер целевыми антигенами*

Сенситин микросфер	Активность сыворотки до инкубации с микросферами	Активность сыворотки после инкубации с сенсibilизированными микросферами	Активность сыворотки после инкубации с микросферами “BSA”
Ail	>3.000	0.892 ± 0.188	2.845 ± 0.104
YapM	0.650 ± 0.124	0.252 ± 0.043	0.700 ± 0.136
YapF	1.509 ± 0.280	0.676 ± 0.285	1.748 ± 0.350
YapL	1.021 ± 0.069	0.478 ± 0.027	1.351 ± 0.007
F1	1 : 200000	1 : 25000	1 : 200000
Psa	0.602 ± 0.012	0.361 ± 0.071	0.722 ± 0.051

* Активность сывороточных препаратов для микросфер, покрытых антигеном F1, выражена титром антител в РНГА, для остальных микросфер – в виде ОП₄₉₂, по данным ТИФА.

Таблица 2. Сила связи в модельной системе “сенсibilизированная антигеном *Y. pestis* микросфера – макрофаг J774”, измеренная методом оптической ловушки

Сенситин микросфер	Число измеренных отрывов	Средняя сила отрыва*, пН
Ail	315	10.83 ± 8.49
YapM	159	8.51 ± 6.63
YapF	135	7.67 ± 6.66
YapL	141	8.29 ± 6.58
Ymt	156	7.22 ± 4.48
F1	170	7.63 ± 4.93
Psa	131	7.11 ± 4.95
BSA	324	8.00 ± 6.23

* Различия достоверны ($p < 0.01$) только между микросферами, покрытыми Ail, и микросферами остальных 7 типов.

Эти результаты подтверждают ранее опубликованные данные, полученные с использованием иных методических подходов, о значимости белка Ail в адгезивности чумного микроба к эукариотическим клеткам нескольких линий [26]. Экспрессия Ail определяет также устойчивость к действию сыворотки, опосредует доставку Yops в клетки хозяина, способствующей дальнейшему развитию инфекционного процесса. Инфицирование мышей мутантным штаммом *Y. pestis* KIM5Δail приводит к резкому повышению значения ЛД₅₀ и снижению обсемененности органов, по сравнению с изогенным диким вариантом возбудителя [27, 28]. Адгезивность Ail, по-видимому, определяется наличием в структуре этого поверхностного белка гидрофобной области, а также двух положительно заряженных участков, которые могут индуцировать гидрофобные или электростатические взаимодействия [5]. Учитывая также то, что адгезивность Ail показана в экспериментах с несколькими типами эукариотических клеток и белков внеклеточного матрикса [18], вполне вероятно, для этого белка нет “своего” рецептора, а опосредованная Ail адгезия носит неспецифический характер и определяется физико-химическими особенностями структуры белка.

С помощью метода оптической ловушки не было выявлено способности Psa адгезировать к клеткам J774. Представленные авторами работы [10] результаты экспериментов с использованием рекомбинантного штамма *E. coli*, несущего ген *psa* *Y. pestis*, и полистироловых микросфер, сенсibilизированных антигеном Psa, показали значимость этого антигена как адгезина в отношении эпителиальных клеток респираторного тракта. При этом степень выраженности адгезивных свойств Psa существенно различалась для трех использованных линий клеток. По данным литературы, этот антиген

не является универсальным, конститутивным адгезином бактерий *Y. pestis*, поскольку способен экспрессироваться лишь в структурах макроорганизма, характеризующихся относительно низкими рН, например, макрофагах, участках абсцессов [29]. Этот антиген участвует в связывании микроба преимущественно с клетками респираторного тракта [30]. Вполне вероятно, что несоответствие полученных нами результатов и результатов вышеупомянутой работы [10] объясняется в том числе и использованием эукариотических клеток различных типов.

Представленные экспериментальные результаты свидетельствуют о том, что F1-антиген не является адгезином чумного микроба, во всяком случае, для макрофагов J774. Как показано ранее с помощью иных методических подходов, этот антиген не способствует адгезии микроба к клеткам не только этой линии [13], но и к клеткам других линий [10]. В обзорных работах, посвященных адгезивности чумного микроба, F1-антиген, как таковой, не рассматривается в качестве адгезина [18, 31].

В условиях настоящего эксперимента не проявлял адгезивности также и антиген Ymt *Y. pestis*. Являясь токсичным для мышей, этот белок не влиял на вирулентность возбудителя в отношении животных этого вида [32], которая, как правило, коррелирует с адгезивностью микроба к клеткам хозяина. Вместе с тем, участие этого антигена в проявлении патогенных свойств *Y. pestis* для теплокровных животных [33], а также механизмы хронического инфицирования блохи, в частности образование биопленки в пищеварительном тракте переносчика, которое определяется в том числе и адгезивностью микробных клеток, высвобождение возбудителя из биопленки нуждаются в дальнейшем исследовании [16]. Подлежит углубленному изучению значимость в этих процессах и белка Ymt.

Из числа аутопереносчиков V_a-типа мы оценили способность трех белков, YapF, YapL и YapM, адгезировать к клеткам J774. Ни один из них не проявил указанной активности при исследовании методом оптической ловушки и выбранных условиях эксперимента.

Адгезивность к клеткам J774 ряда антигенов *Y. pestis*, представлявших больший интерес, дополнительно оценивали с помощью другого методического подхода. В табл. 3 представлены результаты определения уровня пассивной адсорбции сенсibilизированных микросфер на макрофагах, иммобилизованных на стекле.

Как показывают данные табл. 3, 20-минутной коинкубации недостаточно для адгезии сенсibilизированных микросфер на макрофагах. Исключение составил белок Ail, который проявил выраженную способность адгезировать к макрофагам линии J774 уже в течение этого периода

Таблица 3. Пассивная адгезия сенсibilизированных антигенами *Y. pestis* микросфер к иммобилизованному макрофагам J774

Время коинкубации микросфер и макрофагов, мин	№ препарата микросфер	Сенситин микросфер	Число оцененных клеток	Число микросфер, адгезированных на одной клетке, $X_{\text{mean}} \pm m^*$	№ препаратов с существенным различием по $X_{\text{mean}} \pm m$ ($p < 0.01$)
60	1	Ail	202	18.99 ± 2.35	4, 5, 6, 2*
	2	Psa	201	16.07 ± 2.88	4, 5, 3*, 6*
	3	YapF	191	19.29 ± 2.45	4, 5, 6, 2*
	4	YapM	220	12.37 ± 2.01	1, 2, 3, 5
	5	F1-антиген	205	9.84 ± 1.52	1, 2, 3, 4, 6
	6	БСА	216	13.11 ± 1.99	1, 3, 5, 2*
20	7	Ail	84	23.54 ± 4.18	8–12
	8	Psa	93	13.65 ± 2.78	7, 11, 12*
	9	YapF	89	10.98 ± 2.49	7
	10	YapM	99	11.93 ± 2.85	7
	11	F1-антиген	99	9.78 ± 1.78	7, 8
	12	БСА	96	10.24 ± 2.38	7, 8*

* Различие достоверно при $p < 0.05$.

времени. Эти данные подтверждают результаты экспериментов с использованием оптической ловушки (табл. 2), а также результаты, полученные в других лабораториях с применением иных методических подходов. Увеличение времени экспозиции до 60 мин выявило существенное повышение адгезивности еще и для микросфер, сенсibilизированных антигенами Psa и YapF. Учитывая также показанное методом оптической ловушки отсутствие разницы между силой связи с макрофагами микросфер, покрытых двумя этими антигенами, и контрольными микросферами, покрытыми БСА (табл. 2), для проявления их адгезивности с помощью обоих использованных в работе методов требуется значительно большее (и, вероятно, разное) время по сравнению с микросферами, сенсibilизированными белком Ail.

Следует отметить, что если белок YapM не проявил большей адгезивности сравнительно с контролем (БСА) при обоих методах оценки, то антиген F1, скорее всего, придает полистирольной микросфере противоположное свойство. На это указывает достоверно меньшее ($p < 0.01$) количество микросфер на поверхности макрофагов по сравнению с контрольными микросферами, покрытыми БСА, при 60-минутной коинкубации (табл. 3).

В целом, полученные в работе результаты подтвердили адгезивность антигенов Ail и Psa к ряду эукариотических клеток, а также отсутствие указанного свойства у “капсульного” антигена F1 чум-

ного микроба. Кроме того, установлена способность аутогранспортера YapF *Y. pestis* адгерировать к макрофагам J774. По нашему мнению, адгезивность этих белков опосредуется не наличием на поверхности эукариотических клеток строго специфических рецепторов, а носит неспецифический характер, в котором могут быть задействованы гидрофобные и электростатические взаимодействия. Об этом можно судить, в частности, по способности антигенов адгезировать к нескольким компонентам поверхностных структур бактериальной клетки или внеклеточного матрикса. Так, Ail связывается с ламинином, фибронектином, гепарансульфат-протеогликаном [5], Psa – с фосфатидилхолином [35], галактозными остатками гликофинголипидов [36]. Оценивая экспериментальные данные, как ранее опубликованные, так и полученные в настоящей работе, можно утверждать, что адгезивность бактерий *Y. pestis* к эукариотическим клеткам – это интегральный феномен, определяемый совокупностью особенностей поверхностных структур двух биообъектов и окружающих условий их взаимодействия.

Результаты проведенных исследований расширяют представления об адгезивных свойствах патогенных иерсиний на начальной стадии инфекции клеток хозяина, во многом определяющее последующее течение заболевания. Предложенные и апробированные методические подходы могут быть востребованы в исследованиях,

направленных на дальнейшее изучение механизмов патогенеза бактериальных инфекций в целях создания или совершенствования антиадгезивных терапевтических средств.

Работа выполнена в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на 2021–2025 гг.: “Научное обеспечение эпидемиологического надзора и санитарной охраны территории Российской Федерации. Создание новых технологий, средств и методов контроля и профилактики инфекционных и паразитарных болезней”, а также гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых-кандидатов наук (№ МК-3383.2021.1.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ke Y., Chen Z., Yang R.* // *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2013. V. 3. 106.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00106>
2. *Joutsen S., Johansson P., Laukkanen-Ninios R., Björkroth J., Fredriksson-Ahomaa M.* // *Vet Microbiol.* 2020. V. 247. 108798.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108798>
3. *Thomson J.J., Plecha S.C., Krukoniš E.S.* // *Mol. Microbiol.* 2019. V. 111. P. 82–95.
<https://doi.org/10.1111/mmi.14140>
4. *Tsang T.M., Wiese J.S., Felek S., Kronshage M., Krukoniš E.S.* // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 12. e83621.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083621>
5. *Yamashita S., Lukacik P., Barnard T.J., Noinaj N., Felek S., Tsang T.M., Krukoniš E.S., Hinnebusch B.J., Buchanan S.K.* // *Structure.* 2011. V. 19. № 11. P. 1672–1682.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2011.08.010>
6. *Lobo, L. A.* // *FEMS Microbiol. Lett.* 2006. V. 262. № 2. P. 158–162.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00382.x>
7. *Sebbane F., Uversky V.N., Anisimov A.P.* // *Biomolecules.* 2020. V. 10. 1554.
<https://doi.org/10.3390/biom10111554>
8. *Lahteenmaki, K., Kukkonen M., Korhonen T.K.* // *FEBS Lett.* 2001. V. 504. P. 69–72.
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02775-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02775-2)
9. *Felek S., Tsang T.M., Krukoniš E.S.* // *Infect. Immun.* 2010. V. 78. P. 4134–4150.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00167-10>
10. *Liu F., Chen H., Galván E.M., Lasaro M.A., Schifferli D.M.* // *Infect. Immun.* 2006. V. 74. P. 5636–5644.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00612-06>
11. *Huang X.-Z., Lindler L.E.* // *Infect. Immun.* 2004. V. 72. P. 7212–7219.
12. *Abramov V.M., Vasiliev A.M., Vasilenko R.N., Kulikova N.L., Kosarev I.V., Khlebnikov V.S. et al.* // *Biochemistry.* 2001. V. 40. P. 6076–6084.
13. *Du Y., Rosqvist R., Forsberg Å* // *Infect. Immun.* 2002. V. 70. P. 1453–1460.
<https://doi.org/10.1128/IAI.70.3.1453-1460.2002>
14. *Roque A.I., Soliakov A., Birch M.A., Philips S.R., Shah D.S., Lakey J.H.* // *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.).* 2014. V. 26. P. 2704–2616.
<https://doi.org/10.1002/adma.201304645>
15. *Fedorova V.A., Golova A.B.* // *Vestn. Ross Akad Med. Nauk.* 2005. V. 10. P. 19–25.
16. *Hinnebusch B.J., Jarrett C.O., Bland D.M.* // *Biomolecules.* 2021. V. 11. 210.
<https://doi.org/10.3390/biom11020210>
17. *Lenz J.D., Lawrenz M.B., Cotter D.G., Lane M.C., Gonzalez R.J., Palacios M., Miller V.L.* // *J. Bacteriol.* 2011. V. 193. P. 5936–5949.
<https://doi.org/10.1128/JB.05877-11>
18. *Chauhan N., Wrobel A., Skurnik M., Leo J.C.* // *Proteomics Clin. Appl.* 2016. V. 10. № 9–10. P. 949–963.
<https://doi.org/10.1002/prca.201600012>
19. *Yang K., He Y., Park C.G., Kang Y.S., Zhang P., Han Y., Cui Y. et al.* // *Front. Immunol.* 2019. V. 10. 96.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00096>
20. *Osei-Owusu P., Charlton T.M., Kim H.K., Missiakas D., Schneewind O.* // *Nature.* 2019. V. 574. P. 57–62.
<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1570-z>
21. *Bohn E., Sonnabend M., Klein K., Autenrieth I.B.* // *Int. J. Med. Microbiol.* 2019. V. 309. P. 344–350.
<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2019.05.008>
22. *Eichelberger K.R., Sepúlveda V.E., Ford J., Selitsky S.R., Mieczkowski P.A., Parker J.S., Goldman W.E.* // *mSphere.* 2020. V. 5. e00715-20.
<https://doi.org/10.1128/mSphere.00715-20>
23. *Dentovskaya S.V., Shaikhutdinova R.Z., Anisimov A.P.* // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2003. V. 529. P. 419–421.
24. *Бахтеева И.В., Кравченко Т.Б., Тумарева Г.М., Иванов С.А.* // *Проблемы особо опасных инфекций.* 2007. Т. 94. С. 40–44.
25. *Byvalov A.A., Kononenko V.L., Konyshov I.V.* // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2017. V. 53. № 2. P. 234–243.
<https://doi.org/10.15789/2220-7619-2019-3-4-437-448>
26. *Kolodziejek A.M., Hovde C.J., Minnich S.A.* // *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2012. V. 2. 103.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00103>
27. *Felek S., Krukoniš E.S.* // *Infect. Immun.* 2009. V. 77. P. 825–836.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00913-08>
28. *Kolodziejek A.M., Sinclair D.J., Seo K.S., Schneider D.R., Deobald C.F., Rohde H.N., Viall A.K., Minnich S.S., Hovde C.J., Minnich S.A., Bohach G.A.* // *Microbiology (Reading).* 2007. V. 153. P. 2941–2951.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00103>
29. *Lindler L.E., Tall B.D.* // *Mol. Microbiol.* 1993. V. 8. P. 311–324.
30. *Bao R., Nair M.K., Tang W.K., Esser L., Sadhukhan A., Holland R.L., Xia D., Schifferli D.M.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. P. 1065–1070.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1212431110>

31. Leo J.C., Skurnik M. // Adv. Exp. Med. Biol. 2011. V. 715. P. 1–15.
https://doi.org/10.1007/978-94-007-0940-9_1
32. Hinnebusch J., Cherepanov P., Du Y., Rudolph A., Dixon J.D., Schwan T., Forsberg A. // Int. J. Med. Microbiol. 2000. 290. P. 483–487.
[https://doi.org/10.1016/S1438-4221\(00\)80070-3](https://doi.org/10.1016/S1438-4221(00)80070-3)
33. Brown S.D., Montie T.C. // Infect. Immun. 1977. V. 18. P. 85–93.
34. Fan Y., Zhou Y., Feng N., Wang Q., Tian G., Wu X., Liu Z., Bi Y., Yang R., Wang X. // Microbes and Infection. 2016. V. 18. P. 329–335.
35. Galván E.M., Chen H., Schifferli D.M. // Infect. Immun. 2007. V. 75. № 3. P. 1272–1279.
<https://doi.org/10.1128/IAI.01153-06>
36. Payne D., Tatham D., Williamson E.D., Titball R.W. // Infect. Immun. 1998. V. 66. № 9. P. 4545–4548.
<https://doi.org/10.1128/IAI.66.9.4545-4548.1998>

The Role of *Yersinia Pestis* Antigens in Adhesion to J774 Macrophages: an Optical Trapping Study

I. V. Konyshchev^{a, b}, S. A. Ivanov^c, P. H. Kopylov^c, A. P. Anisimov^c,
S. V. Dentovskaya^{c, **}, and A. A. Byvalov^{a, b, *}

^aThe Vyatka State University, Kirov, 610000 Russia

^bInstitute of Physiology, Komi Scientific Centre, Ural Branch, Russian Federation, Syktyvkar, 167982 Russia

^cState Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology Rospotrebnadzor, Obolensk, Serpukhov District, Moscow Region, 142279 Russia

*e-mail: byvalov@nextmail.ru

**e-mail: info@obolensk.org

One of the key stages in the pathogenesis of infections caused by facultative intracellular parasites, including the plague microbe, is bacterial adhesion to the host cells. The adhesiveness of the pathogen is determined, among other things, by the physicochemical properties of its surface structures. The aim of the present work was to evaluate the role of surface antigens in the adhesion of *Yersinia pestis* to murine macrophages J774. The ability of Ail and Psa antigens to adhere to eukaryotic cells was confirmed using optical trapping and/or passive adhesion methods. The autotransporter YapF was shown for the first time to be an adhesin of the plague microbe. It has been suggested that these antigens do not have complementary receptors on the macrophage surface and their adhesiveness is nonspecific. The results of passive adhesion of polystyrene microspheres sensitized by the capsule antigen F1 to macrophages J774, suggest that the inhibitory effect of this antigen is determined not only by the spatial shielding by the capsule of the adhesins involved but also by the physical and chemical properties of this antigen.

Keywords: *Yersinia pestis*, macrophage, adhesion, antigen, optical trap