

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-93>

Оценка действия азоксимера бромид (полиоксидония) на адгезивные свойства вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ по данным атомно-силовой микроскопии

Щуковская Т.Н.[✉], Гончарова А.Ю., Бугоркова С.А., Ерохин П.С., Кудрявцева О.М.

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Россия

Аннотация

Цель. Изучить характер действия азоксимера бромид (полиоксидония, ПО) в условиях культивирования на морфометрические показатели и адгезивность вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ и его изогенных производных *Y. pestis* KM218 (pYT⁻, pYV⁻, pYP⁻), *Y. pestis* KM216 (pYT⁻, pYV⁻, pYP⁺), *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* с применением атомно-силовой микроскопии (АСМ), а также на адгезию клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ к коллагену человека IV типа.

Материалы и методы. Измерения осуществляли с помощью сканирующего зондового микроскопа с использованием стандартных методов полуконтактной АСМ и программы анализа АСМ-изображений. Адгезию *Y. pestis* EV НИИЭГ к коллагену человека IV типа человека определяли по количеству клеток, прикрепившихся к стеклянным слайдам с коллагеном IV типа.

Результаты. Внесение ПО в среду культивирования вызывало достоверные изменения морфометрических параметров клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ и его изогенных производных (увеличение объема, коэффициента уплощённости, индекса *I*), указывающих на повышение пластичности и снижение ригидности клеточной стенки. Данные изменения сопровождались трансформацией наномеханических свойств клеточной поверхности (снижением среднеквадратической шероховатости, силы адгезии), выраженность которых связана с плазмидным профилем. В меньшей степени понижение силы адгезии при отсутствии достоверных изменений индекса *I* наблюдалось у клеток *Y. pseudotuberculosis* I и IV сероваров, а также у бактерий *Y. enterocolitica* 09 серовара с плазмидой pYV⁺. У штамма *Y. enterocolitica* KM383 (pYV⁻) ПО не индуцировал значимых изменений изучаемых показателей. Внесение ПО в среду культивирования приводило также к снижению способности клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ прикрепляться к коллагену человека IV типа. Модификация ПО адгезивных свойств вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ сопровождалась повышением его иммуногенности.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, азоксимера бромид, бактериальная клетка, атомно-силовая микроскопия, морфометрический анализ, поверхностная структура

Источник финансирования. Исследование выполнено при поддержке бюджетного финансирования в рамках темы НИР № АААА-А16-118011590103-А.

Для цитирования: Щуковская Т.Н., Гончарова А.Ю., Бугоркова С.А., Ерохин П.С., Кудрявцева О.М. Оценка действия азоксимера бромид (полиоксидония) на адгезивные свойства вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ по данным атомно-силовой микроскопии. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(3):298–307.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-93>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-93>

Evaluation of azoximer bromide (polyoxidonium) influence on the adhesive properties of the *Yersinia pestis* EV NIIEG vaccine strain by atomic force microscopy

Tatyana N. Shchukovskaya[✉], Anastasiya Y. Goncharova, Svetlana A. Bugorkova, Pavel S. Erokhin, Olga M. Kudryavtseva

Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia

Abstract

Aim. To characterize the influence of azoximer bromide (polyoxidonium, PO) in cultivation conditions on the morpho- and nanomechanical cell surface properties of *Y. pestis* EV NIEG vaccine strain and its derivatives *Y. pestis* KM218 (pYT⁻, pYV⁻, pYP⁻), *Y. pestis* KM216 (pYT⁻, pYV⁻, pYP⁺), *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* by atomic force microscopy (AFM), as well as on the adhesion of cells *Y. pestis* EV NIEG to human collagen type IV.

Materials and methods. The measurements were carried out using the Solver P47-PRO probe microscope (NT-MDT, Russia), standard methods of semi-contact AFM and AFM imaging analysis program. The adhesion of *Y. pestis* EV NIEG to type IV collagen was determined by the number of cells binding to glass slides covered with human collagen type IV.

Results. The introduction of PO in the cultivation environment caused changes in the morphometric parameters of the cells of *Y. pestis* EV NIEG vaccine strain and its isogenic derivatives (increase in volume, flatten ingested (S/H), index *I* (W/H)). These changes were accompanied by the transformation of nanomechanical properties of the cell surface (reducing the root mean square, adhesion force), which countenance was associated with the plasmid profile. The lesser decrease of adhesion force in the absence of changes of the index *I* was observed in cells *Y. pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica* with plasmid pYV. In the strain *Y. enterocolitica* KM383 (pYV⁻) PO did not induce significant changes in the indicators studied. The introduction of the PO into the cultivation environment decreased the ability of *Y. pestis* EV cells to bind to human collagen type IV. Modification by PO the adhesive properties of the vaccine strain *Y. pestis* EV NIEG was accompanied by an increase in its immunogenicity.

Keywords: *Yersinia pestis*, azoximer bromide, bacterial cell, atomic force microscopy, morphometric analysis, surface structure

Funding source. The study was supported by budget funding within the framework of the research topic No. AAAA-A16-118011590103-A.

For citation: Shchukovskaya T.N., Goncharova A.Y., Bugorkova S.A., Erokhin P.S., Kudryavtseva O.M. Evaluation of azoximer bromide (polyoxidonium) influence on the adhesive properties of the *Yersinia pestis* EV NIEG vaccine strain by atomic force microscopy. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(3):298–307.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-49>

Введение

В развитии инфекционного процесса адгезия возбудителя к клеткам-мишеням, компонентам внеклеточного матрикса (ВКМ) играет ключевую роль, во многом определяя его начало, характер и течение [1–3]. Способность чумного микроба к адгезии обусловлена поверхностными структурами бактериальной клетки, которые могут быть представлены белками наружной мембраны — белком Ail, активатором плазминогена Pla, аутотранспортными белками различных классов YadB, YadC, Prp; специализированными органеллами — пилями или фимбриями адгезии, образованными антигеном рН 6; наноразмерными везикулами внешней мембраны с включёнными белками Ail, Pla, капсульным антигеном F1 [4–6]. Наличие адгезинов способствует фиксации возбудителя чумы на поверхности эукариотических клеток, связыванию в различной степени с белками ВКМ ламинином, фибронектином, коллагеном IV типа, транслокации эффекторных белков в клетки-мишени, что обеспечивает уклонение от фагоцитоза и иммунологического распознавания организмом хозяина [1]. При снижении адгезивной активности штаммов чумного микроба разных подвидов зафиксировано повышение поглотительной способности фагоцитов у лабораторных животных [7].

В России синтезирован и внедрен в практику не имеющий аналогов за рубежом иммуноадьювант азоксимера бромид (полиоксидоний, ПО) — водорастворимое N-оксидированное производное полиэтиленпиперазина с молекулярной массой 80 кДа [8]. В условиях *in vivo* ПО обладает выражен-

ным иммуномодулирующим, детоксицирующим, антиоксидантным, мембраностабилизирующим и антигенусиливающим эффектом, применяется в схеме терапии ряда инфекционных заболеваний как вирусной, так и бактериальной этиологии, входит в состав вакцин против гриппа [9, 10].

Особенностью химической структуры ПО является наличие на поверхности его молекулы большого количества различных активных групп, которые могут взаимодействовать с белками поверхностных структур бактериальных клеток [8]. Имеется ряд сообщений об ингибирующем действии ПО на факторы персистенции патогенов. Установлено, что он изменяет адгезивные свойства патогенных и условно-патогенных бактерий и грибов (*Shigella flexneri*, *Salmonella enteritidis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Clostridium difficile*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*), снижает антилизоцимную и антикомплементарную активность микроорганизмов, повышает чувствительность ряда микроорганизмов к определенным антибиотикам групп линкозамидов, фторхинолонов, цефалоспоринов [11, 12].

Для изучения адгезивных свойств микроорганизмов на современном уровне применяются методы бионанотехнологии, оперирующей наноразмерными объектами, среди которых особое место занимает атомно-силовая микроскопия (АСМ). АСМ принадлежит к семейству проксимальной зондовой микроскопии для анализа поверхности и ее свойств на атомно-молекулярном уровне, позволяет проводить одновременное исследование с субнанометро-

вым пространственным разрешением локальных свойств клеточной стенки, в том числе жёсткости, пластичности и адгезивности [13, 14].

Сведения о непосредственном влиянии адьювантов с иммуномодулирующим действием на биологические свойства возбудителей особо опасных заболеваний бактериальной этиологии, архитектонику их поверхностных структур, в том числе клеток вакцинных штаммов, отсутствуют.

Цель исследования — изучение влияния азоксимера бромида на морфометрические характеристики и адгезивность вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ и других представителей рода *Yersinia* (*Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*) с применением АСМ, а также характера действия на адгезию клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ к белку ВКМ — коллагену IV типа.

Материалы и методы

В работе использованы полученные из Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб» вакцинный штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ (pYT⁺, pYV⁺, pYP⁺) и его изогенные производные *Y. pestis* KM218 (pYT⁻, pYV⁻, pYP⁻), *Y. pestis* KM216 (pYT⁻, pYV⁻, pYP⁺), штаммы *Y. pseudotuberculosis* I и IV сероваров, *Y. enterocolitica* KM33(201) (pYV⁺) 09 серовара, *Y. enterocolitica* KM383 (pYV⁻) 09 серовара. Штаммы микроорганизмов культивировали при 28°C и 37°C для *Y. enterocolitica* в течение 48 ч на питательной среде агар LB по Miller pH (7,2 ± 0,1) как с добавлением 60 мкг/мл иммуноадьюванта ПО (терапевтическая концентрация при разовом введении человеку), так и без внесения в среду ПО. Из выращенных культур готовили взвеси в стерильном 0,9% растворе NaCl pH 7,2 по стандартному образцу мутности ОСО 42-28-59-85П 10 единиц, эквивалентному 1 × 10⁹ микробных клеток на 1 мл, которые обеззараживали 2,5% раствором глутарового альдегида в 0,1 мольном какодилатном буфере pH (7,2–7,4) в течение 2 ч при 4°C с последующей проверкой на специфическую стерильность. Для проведения АСМ обеззараженные и дважды отмытые в стерильной дистиллированной воде бактериальные клетки помещали на поверхность подложки (стерильное предметное стекло) и высушивали на воздухе.

Исследования проводили с помощью сканирующего зондового микроскопа «Solver P47-PRO» («NT-MDT», Россия) в режиме прерывистого контакта АСМ следующими методами: полуконтактным, рассогласования и отображения фазы, а также в режиме непрерывного контакта следующими методами: постоянной силы и АСМ-спектроскопии. Использовали кремниевые зонды серии NSG01 («NT-MDT») жесткостью 5,1 Н/м с радиусом кривизны 10 нм и резонансной частотой 150 кГц и CSG30 («NT-MDT») жесткостью 0,1 Н/м с радиу-

сом кривизны 10 нм и резонансной частотой 48 кГц. Исследования проводили при оптимальных значениях основных параметров сканирования: амплитуда колебаний кантилевера Resonance 22 единицы, начальная фаза его колебаний Phase 240°, скорость сканирования Frequency 0,75 Гц, коэффициент усиления цепи обратной связи FB Gain 0,3 единицы, Set Point 19 единиц (величина Set Point и начальный уровень сигнала DFL определяли величину силы взаимодействия зонда с поверхностью образца).

Оценивали морфометрические показатели бактериальных клеток: длину (L), ширину (W), толщину (высоту, H), площадь поперечного сечения (S) и объем (V); коэффициент вытянутости клетки (L/W), характеризующий ее форму; коэффициент уплощенности (S/H), характеризующий степень пластичности клетки; индекс (I) отношения ширины клетки к ее высоте (W/H), характеризующий степень ригидности клеточной стенки; показатель среднеквадратичной шероховатости поверхности (root mean square — RMS), рассчитываемый как среднеквадратичная величина отклонений размеров пиков и впадин от средней линии поверхности подложки; силу адгезии. Обработку и анализ АСМ-изображений не менее чем 30 бактериальных клеток в каждом образце проводили с использованием программного обеспечения «Image Analysis» («NT-MDT»).

Изучение действия ПО на адгезию клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ к коллагену человека IV типа человека («Sigma-Aldrich», C7521) проводили по определению количества бактериальных клеток, прикрепившихся к стеклянным слайдам, предварительно обработанным раствором коллагена IV типа в фосфатно-солевом буфере pH 7,2 ± 0,1 концентрацией 20 мкг/мл [15]. Прикрепившиеся клетки фиксировали парааминомформальдегида, окрашивали кристаллвиолетом и подсчитывали с использованием микроскопа «Olimpus CX 31» с видеокамерой «JVC» в 20 полях зрения в 3 повторах при увеличении 900. Иммуногенность культур *Y. pestis* EV линии НИИЭГ, выращенных на питательной среде агар LB по Miller pH 7,2 ± 0,1 с добавлением ПО и без, оценивали по уровню антигенов к капсульному антигену F1 чумного микроба в сыворотке крови мышей BALB/c на 21-е сутки после иммунизации подкожно дозой 2,5 × 10⁴ колониеобразующих единиц (КОЕ).

Протокол исследований одобрен Комиссией по биоэтике при ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 6 от 09.10.2019).

Определение антигенов проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с применением сертифицированной иммуноферментной тест-системы «ИФА-АТ-Ф1 YERSINIA PESTIS» рег. уд. № ФСР 2012/13946 — 101012 (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб») в строгом соответствии

с инструкцией по применению. Учет оптической плотности осуществляли на микропланшетном фотометре «Stat Fax-3200» при длине волны 405 нм. Наличие антител в сыворотке определяли в 3 повторях и выражали в виде обратного среднегеометрического титра и его среднего квадратического отклонения.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием стандартного пакета программ «Microsoft Office Excel 2016», «Statistica 10.0» («StatSoft Inc.»). Взаимосвязь между переменными определяли с помощью рангового корреляционного анализа по Спирмену. Достоверность различий сравниваемых величин оценивали с помощью парного *t*-критерия Стьюдента. Данные представляли в виде $M \pm m$, где M — среднее значение анализируемого показателя, m — средняя квадратическая ошибка средней арифметической. Значимость различий между группами оценивали с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни. Различия между группами наблюдения считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Выбор питательной среды агар LB по Miller pH $7,2 \pm 0,1$ в качестве среды культивирования для изучения действия ПО на морфометрические характеристики и адгезивность вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ и других представителей рода *Yersinia* обусловлен сравнительно близким по данным транскриптомного анализа характером роста чумного микроба в плазме крови человека [16], что позволяет более адекватно экстраполировать результаты исследований на процессы иммунопатогенеза в организме людей при чуме.

Полученные нами результаты экспериментальных исследований, представленные в табл. 1 и 2, свидетельствуют о непосредственном модифицирующем действии ПО на линейные параметры и адгезивные свойства бактериальных клеток вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ и других представителей рода *Yersinia*. На основании морфометрического анализа установлено достоверное увеличение объема клеток у штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ в 1,62 раза и его изогенных производных *Y. pestis* KM216 (pYT⁻, pYV⁻, pYP⁺), *Y. pestis* KM218 (pYT⁻,

Таблица 1. Морфометрические показатели клеток микроорганизмов рода *Yersinia* при культивировании на среде агар LB по Miller pH $7,2 \pm 0,1$ с добавлением ПО и без по данным АСМ ($M \pm m$)

Table 1. Morphometric cell counts of microorganisms of the genus *Yersinia* in cultivation conditions on the medium LB agar, Miller pH $7,2 \pm 0,1$ with the addition of PO and without it according to atomic-force microscopy ($M \pm m$)

Штаммы Strains	Среда Medium	Длина, мкм Length, μm	Ширина, мкм Width, μm	Высота, мкм Height, μm	Объем, мкм ³ Volume, μm^3
<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ (pYT ⁺ , pYV ⁺ , pYP ⁺) <i>Y. pestis</i> EV NIIIEG	LB агар LB agar	$1,6 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$	$0,36 \pm 0,05$	$0,54 \pm 0,02$
	LB агар + ПО LB agar + PO	$2,4 \pm 0,1^*$	$1,1 \pm 0,1$	$0,32 \pm 0,05$	$0,88 \pm 0,02^*$
<i>Y. pestis</i> KM216 (pYT ⁻ , pYV ⁻ , pYP ⁺)	LB агар LB agar	$1,9 \pm 0,1$	$0,85 \pm 0,1$	$0,35 \pm 0,05$	$0,31 \pm 0,01$
	LB агар + ПО LB agar + PO	$2,1 \pm 0,1$	$0,85 \pm 0,1$	$0,29 \pm 0,05$	$0,54 \pm 0,02^*$
<i>Y. pestis</i> KM218 (pYT ⁻ , pYV ⁻ , pYP ⁻)	LB агар LB agar	$2,4 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$	$0,25 \pm 0,05$	$0,50 \pm 0,02$
	LB агар + ПО LB agar + PO	$2,5 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$	$0,25 \pm 0,05$	$0,59 \pm 0,02^*$
<i>Y. pseudotuberculosis</i> I серовар I serovar	LB агар LB agar	$1,5 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	$0,35 \pm 0,05$	$0,38 \pm 0,02$
	LB агар + ПО LB agar + PO	$1,4 \pm 0,1$	$0,65 \pm 0,1$	$0,30 \pm 0,05$	$0,28 \pm 0,01^*$
<i>Y. pseudotuberculosis</i> IV серовар IV serovar	LB агар LB agar	$1,7 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	$0,35 \pm 0,05$	$0,43 \pm 0,01$
	LB агар + ПО LB agar + PO	$1,9 \pm 0,1$	$0,65 \pm 0,05$	$0,30 \pm 0,05$	$0,39 \pm 0,02$
<i>Y. enterocolitica</i> KM33(201) (pYV ⁺) 09 серовар 09 serovar	LB агар LB agar	$1,4 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$	$0,25 \pm 0,05$	$0,22 \pm 0,01$
	LB агар + ПО LB agar + PO	$1,2 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$	$0,30 \pm 0,05$	$0,23 \pm 0,01$
<i>Y. enterocolitica</i> KM383(pYV ⁻) 09 серовар 09 serovar	LB агар LB agar	$1,4 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$	$0,35 \pm 0,05$	$0,26 \pm 0,01$
	LB агар + ПО LB agar + PO	$1,4 \pm 0,1$	$0,55 \pm 0,1$	$0,30 \pm 0,05$	$0,24 \pm 0,01$

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с параметрами при культивировании на LB агаре.

Note. * $p < 0,05$ in comparison with parameters when cultivating on LB agar.

Таблица 2. Морфо- и наномеханические показатели клеток микроорганизмов рода *Yersinia* при выращивании на среде агар LB по Miller pH 7,2 ± 0,1 с ПО и без по данным АСМ ($M \pm m$)**Table 2.** Morpho- and nanomechanical cell surface properties of microorganisms of the genus *Yersinia* in cultivation conditions on the medium LB agar, Miller pH 7,2 ± 0,1 with PO and without it according to atomic-force microscopy ($M \pm m$)

Штаммы Strains	Среда Medium	Индекс <i>I</i> Index <i>I</i>	<i>S/H</i>	RMS	Сила адгезии, нН Adhesion force, nN
<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ (pYT ⁺ , pYV ⁺ , pYP ⁺) <i>Y. pestis</i> EV NIIEG	LB агар LB agar	2,5 ± 0,1	0,70 ± 0,02	33 ± 1	6,6 ± 0,1
	LB агар + ПО LB agar + PO	3,5 ± 0,1*	0,88 ± 0,03*	25 ± 1*	4,9 ± 0,1*
<i>Y. pestis</i> KM216 (pYT ⁻ , pYV ⁻ , pYP ⁺)	LB агар LB agar	2,4 ± 0,1	0,6 ± 0,02	37 ± 1	6,5 ± 0,1
	LB агар + ПО LB agar + PO	2,9 ± 0,1*	0,67 ± 0,02*	27 ± 1*	5,0 ± 0,1*
<i>Y. pestis</i> KM218 (pYT ⁻ , pYV ⁻ , pYP ⁻)	LB агар LB agar	3,2 ± 0,1	0,64 ± 0,02	30 ± 1	4,7 ± 0,1
	LB агар + ПО LB agar + PO	3,6 ± 0,1*	0,72 ± 0,02*	27 ± 1	4,2 ± 0,1*
<i>Y. pseudotuberculosis</i> I серовар I serovar	LB агар LB agar	2,0 ± 0,1	0,54 ± 0,02	35 ± 2	2,3 ± 0,1
	LB агар + ПО LB agar + PO	2,16 ± 0,10	0,50 ± 0,02	26 ± 1*	1,9 ± 0,1*
<i>Y. pseudotuberculosis</i> IV серовар IV serovar	LB агар LB agar	2,0 ± 0,1	0,54 ± 0,02	36 ± 2	2,7 ± 0,1
	LB агар + ПО LB agar + PO	2,16 ± 0,1	0,51 ± 0,02	27 ± 1*	2,1 ± 0,1*
<i>Y. enterocolitica</i> KM33(201) (pYV ⁺) 09 серовар 09 serovar	LB агар LB agar	2,4 ± 0,1*	0,48 ± 0,02	38 ± 2	3,5 ± 0,1
	LB агар + ПО LB agar + PO	2,0 ± 0,1	0,47 ± 0,02	35 ± 1	2,7 ± 0,1*
<i>Y. enterocolitica</i> KM383(pYV ⁻) 09 серовар 09 serovar	LB агар LB agar	1,7 ± 0,1	0,48 ± 0,02	37 ± 2	2,3 ± 0,1
	LB агар + ПО LB agar + PO	1,8 ± 0,1	0,44 ± 0,02	33 ± 1	2,2 ± 0,1

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с параметрами при культивировании на LB агаре.**Note.** Index *I* — wight/length; *S/H* — square/height; *RMS* — root mean square. * $p < 0,05$ in comparison with parameters when cultivating on LB agar.

pYV⁻, pYP⁻) — в 1,7 и 1,18 раза соответственно ($p < 0,05$) при культивировании на среде с ПО. Коэффициент уплощённости, характеризующий степень пластичности бактериальной клетки [17], также достоверно ($p < 0,05$) увеличивался в 1,26 раза у клеток вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, в 1,1 и 1,12 раза — у штаммов *Y. pestis* KM216, *Y. pestis* KM218 соответственно.

По данным АСМ зарегистрировано значимое ($p < 0,05$) влияние ПО на повышение индекса *I*, уменьшение в нанометровом диапазоне среднеквадратической шероховатости клеточной поверхности и силы адгезии у клеток вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ и его изогенных производных с различным плазмидным составом.

Полученные нами результаты морфометрического анализа свидетельствуют, что введение ПО в состав среды культивирования приводит к увеличению пластичности и снижению ригидности клеточной стенки, среднеквадратической шероховатости клеточной поверхности, силы адгезии чумного микроба, наиболее выраженным у штамма *Y. pestis*

EV НИИЭГ. Корреляционный анализ показал прямую зависимость увеличения коэффициента уплощённости, индекса *I* ($r_s = 0,954-0,979$ при значении критерия Стьюдента $t = 1,61-3,44$) и обратную зависимость — для среднеквадратической шероховатости клеточной поверхности и силы адгезии ($r_s = -(0,967-0,984)$ при значении критерия Стьюдента $t = 1,93-3,52$), что свидетельствовало о функциональной связи выявленных изменений морфометрических показателей с присутствием ПО в среде культивирования. В меньшей степени снижение силы адгезии при отсутствии достоверных изменений индекса *I* под действием ПО наблюдалось у клеток *Y. pseudotuberculosis* I и IV сероваров, а также у бактерий *Y. enterocolitica* 09 серовара с плазмидой pYV⁺. У штамма *Y. enterocolitica* KM 383 (pYV⁻) 09 серовара при культивировании на среде с ПО не выявлено значимых изменений морфометрических показателей бактериальных клеток и наномеханических свойств их поверхности.

Параллельно с определением характера действия ПО на морфометрические характеристики

и адгезивность вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ с применением АСМ нами изучено влияние данного иммуноадьюванта на адгезию клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ к белку ВКМ — коллагену человека IV типа. Коллаген IV типа является ключевым структурным компонентом базальных мембран сосудистого эндотелия и слизистых оболочек. Молекула коллагена IV типа служит лигандом для интегринов, рецепторов на поверхности клеток, обеспечивая клеточную адгезию, миграцию и дифференцировку [18, 19]. Установлено, что введение ПО в состав среды культивирования приводит к достоверному ($p < 0,05$) уменьшению количества клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ, прикрепившихся к коллагену человека IV типа по сравнению с культивированием на среде без ПО — $68 \pm 4,75$ и $96 \pm 10,5$ микробных клеток соответственно. В то же время мало выраженная по силе отрицательная корреляция ($r_s = -0,4755$; $p = 0,04$) свидетельствует о второстепенном значении компонента ВКМ коллагена IV типа в качестве мишени в механизме действия ПО на адгезивность клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ.

Модификация ПО адгезивных свойств вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ сопровождалась изменением его иммуногенности в сторону повышения. Характеристики антигенной активности культур *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенных на питательной среде агар LB по Miller pH $7,2 \pm 0,1$ с добавлением ПО и без него, представлены в табл. 3.

Установлено, что уровень антител к капсульному антигену чумного микроба F1 в 1,7 раза выше в группе животных, иммунизированных вакцинным штаммом *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенным на питательной среде с ПО.

Обсуждение

Известно, что адгезины патогенных иерсиний действуют на разных стадиях инфекционного процесса, выполняют множественные функции,

не только участвуют в процессах прикрепления к клеткам хозяина, но и связаны с проявлением таких свойств, как инвазия, персистенция, выживание в клетках хозяина, биопленкообразование, цитотоксичность [20]. Адгезия бактериальных клеток к контактирующим поверхностям может реализовываться за счет формирования нескольких типов связей, различных по природе и специфичности. К ним относятся неспецифические физико-химические связи, такие как силы Ван-дер-Ваальса, электростатические, гидрофобные, стерические, водородные связи, а также специфические лиганд-рецепторные взаимодействия между поверхностными структурами бактерий (адгезинами) и рецепторами клеток-мишеней организма хозяина [21, 22]. АСМ позволяет получить 3D-изображения единичных бактериальных клеток и их поверхностных ультраструктур, проводить точную морфометрическую оценку их основных параметров, исследовать молекулярные (гидрофобные и электростатические) взаимодействия на поверхности бактерий, картировать физико-химические свойства, измерять ригидность клеточной стенки и адгезивные свойства клеточной поверхности [23, 24]. Результаты нашего исследования показали, что введение ПО в состав среды культивирования приводило к достоверным изменениям индикаторных морфометрических параметров клеток вакцинного штамма чумного микроба *Y. pestis* EV линии НИИЭГ (увеличению объема, коэффициента уплощенности, индекса I), указывающих на повышение пластичности и снижение ригидности клеточной стенки. Выявленные изменения морфометрических показателей сопровождалось трансформацией наномеханических свойств клеточной поверхности (снижением среднеквадратической шероховатости, силы адгезии) бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ, что свидетельствует о присутствии молекулярных мишеней для ПО на наружной мембране чумного микроба.

Таблица 3. Титры антител к капсульному антигену F1 чумного микроба в сыворотке крови мышей BALB/c, вакцинированных *Y. pestis* EV НИИЭГ в условиях культивирования на среде агар LB по Miller pH $7,2 \pm 0,1$ с добавлением ПО и без ($M \pm m$)

Table 3. Antibody titers to *Y. pestis* F1 capsule antigen in serum BALB/c mice vaccinated with *Y. pestis* EV NIIEG cultivated on LB agar, Miller pH $7,2 \pm 0,1$ with the addition of PO and without it ($M \pm m$)

Иммунизирующий штамм, доза (КОЕ) Strain used for immunization, dose (CFU)	Количество животных Number of animals	Реципрокные значения среднегеометрического титра Geometric mean reciprocal titers
<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ (LB агар, Miller pH 7,2) <i>Y. pestis</i> EV NIIEG (LB agar, Miller pH 7,2) $2,5 \times 10^4$	10	$76 \pm 35,43$
<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ (LB агар, Miller pH 7,2 + ПО) <i>Y. pestis</i> EV NIIEG (LB agar, Miller pH 7,2 + PO) $2,5 \times 10^4$	10	$136 \pm 36,6^*$
0,9% NaCl	10	< 40

Примечание. * $p < 0,05$ по отношению к группе сравнения, иммунизированных *Y. pestis* EV НИИЭГ.
Note. $p < 0.05$ in comparison with mice immunized with *Y. pestis* EV NIIEG.

Биологические функции напрямую связаны с составом и организацией микробной поверхности. Ряд идентифицированных белков наружной мембраны патогенных иерсиний, функции которых определяют адгезию микробных клеток к структурным компонентам хозяина, относятся к ауотранспортным белкам или системе секреции V типа. Патогенные виды рода *Yersinia* экспрессируют ауотранспортные белки типов Va, Vc и Ve [4]. YadA — многофункциональный белок наружной мембраны *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*, относящийся к адгезинам типа Vc и кодируемый плазмидой вирулентности pYV (pCad). Помимо осуществления основной функции — адгезии бактерий, YadA участвует в процессах аутоагглютинации, инвазии, устойчивости к фагоцитозу, бактерицидному действию сыворотки. Интенсивность биосинтеза YadA возрастает при 37°C, обеспечивая покрытие этим белком значительной части поверхности микробной клетки [20]. Как показали результаты настоящего исследования, ПО, по-видимому, может оказывать ингибирующее действие на продукцию белка YadA, на что указывают значимое снижение силы адгезии у бактериальных клеток штамма *Y. enterocolitica* KM-33(201) 09 серовара с плазмидой pYV (pCad⁺) при отсутствии таковых у *Y. enterocolitica* KM 383 (pYV⁻) 09 серовара в одинаковых условиях культивирования на среде с ПО при 37°C.

Одним из факторов адгезии возбудителя чумы является активатор плазминогена Pla, принадлежащий к семейству сериновых протеаз наружных мембран энтеробактерий и кодируемый видоспецифичной плазмидой pYP (pPla, pPCP1 или pPst). Четвертичная структура белка представлена 5 периплазматическими и 5 внеклеточными петлями, выступающими в межклеточное пространство на расстоянии около 40 Å от липидного бислоя наружной мембраны. Белок Pla *Y. pestis*, помимо активации плазминогена и превращения его в плазмин путем ограниченного протеолиза, способен к гидролизу С3 компонента комплемента, протеолитическому инаktivированию антимикробного пептида — кателицидина LL-37, а также TNF- α , IFN- γ , IL-8 и протеина 1 хемотаксиса моноцитов [25, 26]. Сравнительный анализ полученных нами данных АСМ штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ и его изогенных производных показал, что у безплазмидного штамма *Y. pestis* KM218 (pYT⁻, pYV⁻, pYP⁻) значение силы адгезии достоверно ($p < 0,05$) меньше таковых, измеренных для клеток штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ (pYT⁺, pYP⁺, pYV⁺) и штамма *Y. pestis* KM216, имеющего только одну плазмиду pYP. Введение ПО в состав среды культивирования приводило к значимому снижению показателя среднеквадратичной шероховатости поверхности и силы адгезии у клеток вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ и

его изогенных производных, выраженность проявлений которых зависела от плазмидного профиля. У штамма *Y. pestis* KM218, утратившего плазмиды pYP, pYV и pYT, зарегистрированы наиболее низкие исходные показатели адгезивных свойств клеточной поверхности бактерий и наименее значимые их изменения под действием ПО.

Активатор плазминогена Pla также может избирательно связываться с белками ВКМ и базальными мембранами (ламинином, коллагеном IV типа), обеспечивая тем самым уклонение от захвата профессиональными фагоцитами хозяина в мало доступных лейкоцитам местах [25, 27]. Нами установлено, что введение ПО в состав среды культивирования приводило к снижению способности клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ прикрепляться к коллагену человека IV типа — ключевому структурному компоненту базальных мембран сосудистого эндотелия и слизистых оболочек.

Как известно, липополисахарид (ЛПС) представляет собой сигнальную молекулу, распознаваемую системой врожденного иммунитета и обеспечивающую её активацию на самых ранних стадиях вакцинального процесса. Антигенпрезентирующие клетки (дендритные, клетки Лангерганса) организма хозяина экспрессируют на своей поверхности лектиновые рецепторы DC-SIGN (DC-specific intercellular adhesion molecule-grabbing nonintegrin receptor) или CD209 и лангерин (CD207), которые могут связываться непосредственно с коровой областью ЛПС *Y. pestis* [28]. CD209 представлен также на поверхности макрофагов, включая альвеолярные макрофаги человека [29]. С помощью атомно-силовой спектроскопии с использованием оптической ловушки показано непосредственное участие в связывании с мембраной макрофага коровой области ЛПС *Y. pestis* вакцинного штамма EV НИИЭГ [30]. Установлено, что при 28°C синтезируется гекса-ацилированная форма липида А ЛПС *Y. pestis* со стимулирующей паттернраспознающей TLR4/MD2-рецептор активностью, имеющей важное значение в инициации формирования антибактериального адаптивного иммунитета [31, 32]. По данным S. Montminy и соавт. [33], мутант вирулентного штамма *Y. pestis* KIM1001-pLpxL с конститутивным синтезом гексагональной формы липида А утрачивал вирулентность для биопробных животных при наличии всех известных детерминант вирулентности и индуцировал формирование защиты в эксперименте от бубонной и легочной форм чумы. В нашей работе зарегистрировано повышение иммуногенных свойств культур вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенных на питательной среде с добавлением ПО при 28°C. По-видимому, особенность химической структуры ПО (сополимер N-окси-1,4-этиленпиперазина и (N-карбоксо)-1,4-этиленпиперазиния бромида), связанной с на-

личиём N-оксидных и карбоксильных групп, может способствовать изменению экспрессии адгезинов на клеточной поверхности и повышению функциональной активности гекса-ацилированного ЛПС за счет уменьшения его экранирования и изменения пространственной ориентации. Также результаты настоящего исследования свидетельствуют о возможной связи направленности трансформирующего действия ПО наномеханических свойств клеточной поверхности (среднеквадратической шероховатости, силы адгезии) со снижением биосинтеза адгезинов, кодируемых плазмидой рУР у вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ и плазмидой рYV у штаммов других представителей рода *Yersinia* (*Y. pseudotuberculosis* I и IV сероваров, *Y. enterocolitica* 09 серовара). Вопрос о молекулярных механизмах этого воздействия и связи с защитной эффективностью вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ от чумной инфекции является предметом дальнейших исследований.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Ribet D., Cossart P. How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. *Microbes Infect.* 2015; 17(3): 173–83. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2015.01.004>
- Tsang T.M., Annis D.S., Kronshage M., Fenno J.T., Usselman L.D., Mosher D.F., et al. Ail protein binds ninth type III fibronectin repeat (9FNIII) within central 120-kDa region of fibronectin to facilitate cell binding by *Yersinia pestis*. *J. Biol. Chem.* 2012; 287(20): 16759–67. <https://doi.org/10.1074/jbc.m112.358978>
- Vaca D.J., Thibau A., Schütz M., Kraiczky P., Happonen L., Malmström J., et al. Interaction with the host: the role of fibronectin and extracellular matrix proteins in the adhesion of Gram-negative bacteria. *Med. Microbiol. Immunol.* 2020; 209(3): 277–99. <https://doi.org/10.1007/s00430-019-00644-3>
- Куклева Л.М. Адгезины возбудителя чумы. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2018; (2): 14–22. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2018-2-14-22>
- Eddy J.L., Gielda L.M., Caulfield A.J., Rangel S.M., Latham W.W. Production of outer membrane vesicles by the plague pathogen *Yersinia pestis*. *PLoS One.* 2014; 9(9): e107002. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107002>
- Qing G., Gong N., Chen X., Chen J., Zhang H., Wang Y., et al. Natural and engineered bacterial outer membrane vesicles. *Biophys. Rep.* 2019; 5(4): 184–98. <https://doi.org/10.1007/s41048-019-00095-6>
- Дубровина В.И., Мухтургин Г.Б., Балахонов С.В., Витязева С.А., Старовойтова Т.П., Иванова Т.А. и др. Изучение иммунофизиологических свойств штаммов чумного микроба с различным плазмидным составом. *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук.* 2013; (6): 136–9.
- Петров Р.В., Хайтов Р.М., Некрасов А.В., Аттаулаханов Р.И., Пучкова Н.Г., Иванова А.С. и др. Полиоксидоний: Механизм действия и клиническое применение. *Медицинская иммунология.* 2000; 2(3): 271–8.
- Омельченко Н.Д., Иванова И.А., Беспалова И.А., Филиппенко А.В. Иммуномодуляторы и специфическая профилактика инфекционных болезней. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2017; (3): 21–6. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2017-3-21-2>
- Shakya A.K., Nandakumar K.S. Applications of polymeric adjuvants in studying autoimmune responses and vaccination against infectious diseases. *J. R. Soc. Interface.* 2013; 10(79): 20120536. <https://doi.org/10.1098/rsif.2012.0536>
- Крылов Д.А., Чайникова И.Н., Перунова Н.Б., Челпаченко О.Е., Паньков А.С., Смолягин А.И. и др. Влияние иммуномодулятора полиоксидония на биологические свойства микроорганизмов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2003; (4): 74–8.
- Харсеева Г.Г., Москаленко Е.П., Алутина Э.Л., Бредао А.М. Влияние полиоксидония на адгезивные свойства *Corynebacterium diphtheriae*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2009; (2): 11–5.
- Сафенкова И.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Применение атомно-силовой микроскопии для характеристики единичных межмолекулярных взаимодействий. *Успехи биологической химии.* 2012; 52: 281–314.
- Beaussarta A., El-Kirat-Chatel S. Microbial adhesion and ultrastructure from the single-molecule to the single-cell levels by Atomic Force Microscopy. *Cell Surf.* 2019; 5: 10003. <https://doi.org/10.1016/j.tcs.2019.100031>
- Yamashita S., Lukacik P., Barnard T.J., Noinaj N., Felek S., Tsang T.M., et al. Structural insights into Ail-mediated adhesion in *Yersinia pestis*. *Structure.* 2011; 19(11): 1672–82. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.08.010>
- Chauvaux S., Dillies M.A., Marceau M., Rosso M.L., Rousseau S., Moszer I., et al. *In silico* comparison of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* transcriptomes reveals a higher expression level of crucial virulence determinants in the plague bacillus. *Int. J. Med. Microbiol.* 2011; 301(2): 105–16. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.08.013>
- Уткин Д.В., Булгакова Е.Г., Ерохин П.С., Кузнецов О.С., Куклев В.Е., Осина Н.А. Исследование морфологических особенностей клеток бактерий *Yersinia pestis*, выращенных при различных температурных условиях, методом атомно-силовой микроскопии. *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология.* 2019; 19(1): 87–93. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2019-19-1-87-93>
- Arseni L., Lombardi A., Orioli D. From structure to phenotype: impact of collagen alterations on human health. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19(5): 1407. <https://doi.org/10.3390/ijms19051407>
- Karsdal M.A., ed. *Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin.* Oxford: Academic Press; 2019. <https://doi.org/10.1016/C2018-0-00074-2>
- Бывалов А.А., Конышев И.В. Адгезины *Yersinia pseudotuberculosis*. *Инфекция и иммунитет.* 2019; 9(3–4): 437–48. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2019-3-4-437-448>
- Ma C.D., Acevedo-Vélez C., Wang C., Gellman S.H., Abbott N.L. Interaction of the hydrophobic tip of an atomic force microscope with oligopeptides immobilized using short and long tethers. *Langmuir.* 2016; 32(12): 2985–95. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b04618>
- Iqbal K.M., Bertino M.F., Shah M.R., Ehrhardt C.J., Yadvalli V.K. Nanoscale phenotypic textures of *Yersinia pestis* across environmentally-relevant matrices. *Microorganisms.* 2020; 8(2): 160. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020160>
- Плескова С.Н., Дубровин Е.В., Голубева И.С., Горшкова Е.Н., Пудовкина Е.Е. Нанотехнологическая АСМ-морфометрия бактериальных клеток. *Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского.* 2013; (2-2): 34–8.
- Yuan Y., Hays M.P., Hardwidge P.R., Kim J. Surface characteristics influencing bacterial adhesion to polymeric substrates. *RSC Advances.* 2017; 7: 14254–61. <https://doi.org/10.1039/c7ra01571b>
- Евсеева В.В., Платонов М.Е., Копылов П.Х., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Активатор плазминогена чумного микроба. *Инфекция и иммунитет.* 2015; 5(1): 27–36. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2015-1-27-36>

26. Куклева Л.М., Бойко А.В. Активатор плазминогена – многофункциональный белок возбудителя чумы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016; (3): 13–20. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-3-13-20>
27. Kienle Z., Emody L., Svanborg C., O'Tool P.W. Adhesive properties conferred by the plasminogen activator of *Yersinia pestis*. *J. Gen. Microbiol.* 1992; 138(Pt. 8): 1679–87.
28. Zhang P., Skurnik M., Zhang S., Schwartz O., Kalyanasundaram R., Bulgheresi S., et al. Human dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-grabbing nonintegrin (CD209) is a receptor for *Yersinia pestis* that promotes phagocytosis by dendritic cells. *Infect. Immun.* 2008; 76(5): 2070–9. <https://doi.org/10.1128/IAI.01246-07>
29. Yang K., He Y., Park C.G., Kang Y.S., Zhang P., Han Y., et al. *Yersinia pestis* interacts with SIGNR1 (CD209b) for promoting host dissemination and infection. *Front. Immunol.* 2019; 10: 96. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00096>
30. Byvalov A.A., Kononenko V.L., Konyshov I.V. Single-cell force spectroscopy of interaction of lipopolysaccharides from *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* with J774 macrophage membrane using optical tweezers. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A*. 2018; 12: 93–106. <https://doi.org/10.1134/S1990747818020058>
31. Книрель Ю.А., Анисимов А.П. Липополисахарид чумного микроба *Yersinia pestis*: структура, генетика, биологические свойства. *Acta Naturae*. 2012; 4(3): 49–61. <https://doi.org/10.32607/20758251-2012-4-3-46-58>
32. Wang C., Stanciu C.E., Ehrhardt C.J., Yadavalli V.K. The effect of growth temperature on the nanoscale biochemical surface properties of *Yersinia pestis*. *Anal. Bioanal. Chem.* 2016; 408(40): 5585–91. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9659-9>
33. Montminy S., Khan N., McGrath S., Walkowicz M. J., Sharp F., Conlon J.E., et al. Virulence factors of *Yersinia pestis* are overcome by a strong lipopolysaccharide response. *J. Nature Immun.* 2006; 7(10): 1066–73. <https://doi.org/10.1038/ni1386>
8. Petrov R.V., Khaitov R.M., Nekrasov A.V., Attalukhanov R.I., Puchkova N.G., Ivanova A.S. et al. Polyoxidonium – mechanisms of action and clinical relevance. *Meditinskaya immunologiya*. 2000; 2(3): 271–8. (in Russian)
9. Omel'chenko N.D., Ivanova I.A., Bessalova I.A., Filippenko A.V. Immunomodulators and specific prophylaxis of infectious diseases. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2017; (3): 21–6. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2017-3-21-2> (in Russian)
10. Shakya A.K., Nandakumar K.S. Applications of polymeric adjuvants in studying autoimmune responses and vaccination against infectious diseases. *J. R. Soc. Interface*. 2013; 10(79): 20120536. <https://doi.org/10.1098/rsif.2012.0536>
11. Krylov D.A., Chaynikova I.N., Perunova N.B., Chelpachenko O.E., Pan'kov A.S., Smolyagin A.I., et al. Effect of a Polyoxidonium immunoregulator on the biological properties of microorganisms. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2003; (4): 74–8. (in Russian)
12. Kharseeva G.G., Moskalenko E.P., Alutina E.L., Breda A.M. Influence of Polyoxidonium on adhesive properties of *Corynebacterium diphtheriae*. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2009; (2): 11–5. (in Russian)
13. Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Application of atomic force microscopy for characteristics of single intermolecular interactions. *Uspekhi biologicheskoy khimii*. 2012; 52: 281–314. (in Russian)
14. Beaussarta A., El-Kirat-Chatel S. Microbial adhesion and ultrastructure from the single-molecule to the single-cell levels by Atomic Force Microscopy. *Cell Surf.* 2019; 5: 10003. <https://doi.org/10.1016/j.tcsu.2019.100031>
15. Yamashita S., Lukacik P., Barnard T.J., Noinaj N., Felek S., Tsang T.M., et al. Structural insights into Ail-mediated adhesion in *Yersinia pestis*. *Structure*. 2011; 19(11): 1672–82. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.08.010>
16. Chauvaux S., Dillies M.A., Marceau M., Rosso M.L., Rousseau S., Moszer L., et al. *In silico* comparison of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* transcriptomes reveals a higher expression level of crucial virulence determinants in the plague bacillus. *Int. J. Med. Microbiol.* 2011; 301(2): 105–16. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.08.013>
17. Utkin D.V., Bulgakova E.G., Erokhin P.S., Kuznetsov O.S., Kuklev V.E., Osina N.A. Study of the morphological features of the cells of the bacteria *Yersinia pestis*, grown at different temperatures by atomic force microscopy. *Izvestiya Saratovskogo universiteta. Novaya seriya. Seriya: Khimiya. Biologiya. Ekologiya*. 2019; 19(1): 87–93. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2019-19-1-87-93> (in Russian)
18. Arseni L., Lombardi A., Orioli D. From structure to phenotype: impact of collagen alterations on human health. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19(5): 1407. <https://doi.org/10.3390/ijms19051407>
19. Karsdal M.A., ed. *Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin*. Oxford: Academic Press; 2019. <https://doi.org/10.1016/C2018-0-00074-2>
20. Byvalov A.A., Konyshov I.V. *Yersinia pseudotuberculosis*-derived adhesins. *Infektsiya i immunitet*. 2019; 9(3–4): 437–48. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2019-3-4-437-448> (in Russian)
21. Ma C.D., Acevedo-Vélez C., Wang C., Gellman S.H., Abbott N.L. Interaction of the hydrophobic tip of an atomic force microscope with oligopeptides immobilized using short and long tethers. *Langmuir*. 2016; 32(12): 2985–95. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b04618>
22. Iqbal K.M., Bertino M.F., Shah M.R., Ehrhardt C.J., Yadavalli V.K. Nanoscale phenotypic textures of *Yersinia pestis* across environmentally-relevant matrices. *Microorganisms*. 2020; 8(2): 160. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020160>
23. Pleskova S.N., Dubrovin E.V., Golubeva I.S., Gorshkova E.N., Pudovkina E.E. Nanotechnology AFM-morphometry of bacte-

REFERENCES

1. Ribet D., Cossart P. How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. *Microbes Infect.* 2015; 17(3): 173–83. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2015.01.004>
2. Tsang T.M., Annis D.S., Kronshage M., Fenno J.T., Usselman L.D., Mosher D.F., et al. Ail protein binds ninth type III fibronectin repeat (9FNIII) within central 120-kDa region of fibronectin to facilitate cell binding by *Yersinia pestis*. *J. Biol. Chem.* 2012; 287(20): 16759–67. <https://doi.org/10.1074/jbc.m112.358978>
3. Vaca D.J., Thibau A., Schütz M., Kraiczky P., Happonen L., Malmström J., et al. Interaction with the host: the role of fibronectin and extracellular matrix proteins in the adhesion of Gram-negative bacteria. *Med. Microbiol. Immunol.* 2020; 209(3): 277–99. <https://doi.org/10.1007/s00430-019-00644-3>
4. Kуклева L.M. Adhesins of the plague agent. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2018; (2): 14–22. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2018-2-14-22> (in Russian)
5. Eddy J.L., Gielda L.M., Caulfield A.J., Rangel S.M., Latham W.W. Production of outer membrane vesicles by the plague pathogen *Yersinia pestis*. *PLoS One*. 2014; 9(9): e107002. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107002>
6. Qing G., Gong N., Chen X., Chen J., Zhang H., Wang Y., et al. Natural and engineered bacterial outer membrane vesicles. *Biophys. Rep.* 2019; 5(4): 184–98. <https://doi.org/10.1007/s41048-019-00095-6>
7. Dubrovina V.I., Mukhturgin G.B., Balakhonov S.V., Vityazeva S.A., Starovoytova T.P., Ivanova T.A. et al. Studying of immunophysiological properties of *Yersinia pestis* strains with various plasmid composition. *Byulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2013; (6): 136–9. (in Russian)

- rial cells. *Vestnik of Lobachevsky of State University of Nizhny Novgorod*. 2013; (2-2): 34–8. (in Russian)
24. Yuan Y., Hays M.P., Hardwidge P.R., Kim J. Surface characteristics influencing bacterial adhesion to polymeric substrates. *RSC Advances*. 2017; 7: 14254–61. <https://doi.org/10.1039/c7ra01571b>
25. Evseeva V.V., Platonov M.E., Kopylov P.Kh., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. Plasminogen activator of *Yersinia pestis*. *Infectsiya i immunitet*. 2015; 5(1): 27–36. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2015-1-27-36> (in Russian)
26. Kukleva L.M., Boyko A.V. Plasminogen activator — multifunctional protein of plague pathogen. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2016; (3): 13–20. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-3-13-20> (in Russian)
27. Kienle Z., Emody L., Svanborg C., O'Tool P.W. Adhesive properties conferred by the plasminogen activator of *Yersinia pestis*. *J. Gen. Microbiol.* 1992; 138(Pt. 8): 1679–87.
28. Zhang P., Skurnik M., Zhang S., Schwartz O., Kalyanasundaram R., Bulgheresi S., et al. Human dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-grabbing nonintegrin (CD209) is a receptor for *Yersinia pestis* that promotes phagocytosis by dendritic cells. *Infect. Immun.* 2008; 76(5): 2070–9. <https://doi.org/10.1128/IAI.01246-07>
29. Yang K., He Y., Park C.G., Kang Y.S., Zhang P., Han Y., et al. *Yersinia pestis* interacts with SIGNR1 (CD209b) for promoting host dissemination and infection. *Front. Immunol.* 2019; 10: 96. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00096>
30. Byvalov A.A., Kononenko V.L., Konyshov I.V. Single-cell force spectroscopy of interaction of lipopolysaccharides from *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* with J774 macrophage membrane using optical tweezers. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A*. 2018; 12: 93–106. <https://doi.org/10.1134/S1990747818020058>
31. Knirel' Yu.A., Anisimov A.P. Lipopolysaccharide of *Yersinia pestis*, the cause of plague: structure, genetics, biological properties. *Acta Naturae*. 2012; 4(3): 49–61. <https://doi.org/10.32607/20758251-2012-4-3-46-58> (in Russian)
32. Wang C., Stanciu C.E., Ehrhardt C.J., Yadavalli V.K. The effect of growth temperature on the nanoscale biochemical surface properties of *Yersinia pestis*. *Anal. Bioanal. Chem.* 2016; 408(40): 5585–91. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9659-9>
33. Montminy S., Khan N., McGrath S., Walkowicz M. J., Sharp F., Conlon J.E., et al. Virulence factors of *Yersinia pestis* are overcome by a strong lipopolysaccharide response. *J. Nature Immun.* 2006; 7(10): 1066–73. <https://doi.org/10.1038/ni1386>

Информация об авторах

Щуковская Татьяна Николаевна[✉] — д.м.н., проф., г.н.с. отд. иммунологии РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, Россия, tatyanaschuk@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8995-0894>

Гончарова Анастасия Юрьевна — к.м.н., н.с. отд. иммунологии, РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9994-7936>

Бугоркова Светлана Александровна — д.м.н., и.о. зав. отд. иммунологии РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7548-4845>

Ерохин Павел Сергеевич — к.ф.-м.н., н.с. лаб. диагностических технологий РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9525-8327>

Кудрявцева Ольга Михайловна — к.б.н., с.н.с. отд. иммунологии, РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9894-3394>

Участие авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Статья поступила в редакцию 28.10.2020;
принята к публикации 14.12.2021
опубликована 10.03.2021

Information about the authors

Tatyana N. Shchukovskaya[✉] — D. Sci. (Med.), Prof., main researcher, Department of immunology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia, tatyanaschuk@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8995-0894>

Anastasiya Y. Goncharova — Cand. Sci. (Med.), researcher, Department of immunology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9994-7936>

Svetlana A. Bugorkova — D. Sci. (Med.), deputy head, Department of immunology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7548-4845>

Pavel S. Erokhin — Cand. Sci. (Phys.-Math.), researcher, Laboratory of diagnostic technologies, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9525-8327>

Olga M. Kudryavtseva — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Department of immunology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9894-3394>

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

The article was submitted 28.10.2020;
accepted for publication 14.12.2021;
published 10.03.2021