

УДК 576.32/.36

DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ625575>

ВЛИЯНИЕ НИСТАТИНА НА ИНВАЗИЮ БАКТЕРИЙ *SERRATIA GRIMESII* И *SERRATIA PROTEAMACULANS* В ЭПИТЕЛИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ

Ю.М. Берсон

Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

Для цитирования: Берсон Ю.М. Влияние нистатина на инвазию бактерий *Serratia grimesii* и *Serratia proteamaculans* в эпителиальные клетки // Медицинский академический журнал. 2024. Т. 24. № 1. С. 83–95. DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ625575>

Рукопись получена: 12.01.2024

Рукопись одобрена: 19.02.2024

Опубликована online: 24.05.2024

Обоснование. При проникновении в нефагоцитирующие клетки бактерии задействуют различные эндоцитарные пути. Для многих бактериальных патогенов было показано участие caveол/липидных рафтов в процессе бактериальной инвазии. Однако для бактерий рода *Serratia* мало изучено вовлечение мембранных микродоменов в процесс интернализации бактерий.

Цель — установить участие caveол/липидных рафтов в инвазии бактерий *S. grimesii* и *S. proteamaculans* в нефагоцитирующие эпителиоподобные клетки Caco-2 и M-HeLa с помощью нистатина.

Материалы и методы. Эпителиальные клетки M-HeLa и Caco-2 инкубировали с 50 мкмоль/л нистатина в течение 1 ч при 37 °С, после чего заражали бактериями *S. grimesii* штамм 30063 и *S. proteamaculans* штамм 94, множественность заражения составляла 100 бактерий на клетку. Количество внутриклеточных бактерий оценивали с использованием гентамицина. Уровень caveолина-1 в клетках визуализировали с помощью конфокальной микроскопии и вестерн-блоттинга. Изменение экспрессии генов, кодирующих Toll-подобные рецепторы, измеряли методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Результаты. Обработка эпителиальных клеток нистатином приводит к уменьшению интернализации бактерий *S. grimesii* и *S. proteamaculans* в клетки M-HeLa на 30 % и не влияет на проникновение в клетки Caco-2. При этом нистатин не оказывает влияния на перераспределение/нарушение целостности липидных рафтов, не приводит к реорганизации цитоскелета эукариотических клеток. Добавление нистатина увеличивает уровень caveолина-1 в клетках M-HeLa (в Caco-2 caveолин-1 не экспрессируется), что приводит к изменению текучести плазматической мембраны. Нистатин способствует секреции провоспалительных цитокинов интерлейкина-6 и интерлейкина-8 в обеих клеточных линиях. Заражение предварительно обработанных нистатином клеток M-HeLa исследуемыми бактериями приводит к увеличению экспрессии генов *tlr2* и *tlr4*, но не превосходит уровень их экспрессии в контрольных образцах, поэтому нельзя однозначно говорить об участии Toll-подобных рецепторов в инвазии бактерий *Serratia*.

Заключение. Полученные данные позволяют предположить, что взаимодействие бактерий с эукариотическими клетками индуцирует экспрессию caveолина-1, что приводит к изменению подвижности компонентов плазматической мембраны. Это может быть связано с тем, что в инвазии исследуемых бактерий участвует β 1-интегрин, который должен стабилизироваться на плазматической мембране при связывании с лигандом за счет образования мембранного микроокружения, богатого холестерином и сфинголипидами.

Ключевые слова: бактериальная инвазия; *Serratia*; нистатин; плазматическая мембрана; TLR.

EFFECT OF NYSTATIN ON INVASION OF *SERRATIA GRIMESII* AND *SERRATIA PROTEAMACULANS* BACTERIA INTO EPITHELIAL CELLS

Yuliya M. Berson

Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

For citation: Berson YuM. Effect of nystatin on invasion of *Serratia grimesii* and *Serratia proteamaculans* bacteria into epithelial cells. *Medical Academic Journal*. 2024;24(1):83–95. DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ625575>

Received: 12.01.2024

Accepted: 19.02.2024

Published online: 24.05.2024

Список сокращений

ИЛ (IL) — интерлейкин; КОЕ (CFU) — колониеобразующая единица; ЛПС — липополисахарид; СТхВ — субъединица В холерного токсина; ОТ-ПЦР — обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция; цАМФ — циклический аденозинмонофосфат; DAPI — 4,6-диамино-2-фенилиндол; DMEM — Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DPBS — фосфатно-солевой раствор Дюльбекко; LB — среда Луриа — Бергана; МОИ — множественность заражения; PBS — фосфатно-солевой буфер; TLR — Toll-подобный рецептор.

BACKGROUND: Bacteria use various endocytic pathways during entering non-phagocytic cells. The involvement of caveolae/lipid rafts in bacterial invasion has been demonstrated for many bacterial pathogens. However, for bacteria of the genus *Serratia*, the involvement of membrane microdomains in the process of bacterial internalization has been poorly studied.

AIM: To evaluate the involvement of caveolae/lipid rafts in the invasion of *S. grimesii* and *S. proteamaculans* bacteria into non-phagocytic epithelial Caco-2 and M-HeLa cells using nystatin.

MATERIALS AND METHODS: M-HeLa and Caco-2 epithelial cells were incubated with 50 μ M nystatin for 1 hour at 37 °C, after which they were infected with the bacteria *S. grimesii* strain 30063 and *S. proteamaculans* strain 94, the multiplicity of infection was 100 bacteria per cell. The number of intracellular bacteria was assessed using gentamicin protection assay. The level of caveolin-1 in cells was visualized using confocal microscopy and Western blotting. The expression of Toll-like receptors genes were measured by real-time RT-PCR.

RESULTS: Treatment of epithelial cells with nystatin reduces the internalization of *S. grimesii* and *S. proteamaculans* into M-HeLa cells by 30% and does not affect penetration into Caco-2 cells. At the same time, nystatin does not affect the redistribution / the integrity impairment of lipid rafts and does not lead to the cytoskeleton reorganization of eukaryotic cells. The addition of nystatin increases the level of caveolin-1 in M-HeLa cells (caveolin-1 is not expressed in Caco-2), which leads to a change plasma membrane fluidity. Nystatin promotes the secretion of proinflammatory cytokines interleukin-6 and interleukin-8 in both cell lines. Infection of M-HeLa cells pretreated with nystatin with the studied bacteria leads to an increase in the expression of *tlr2* and *tlr4* genes, but does not exceed the level of their expression in control samples. Therefore, it is impossible to speak unambiguously about the participation of Toll-like receptors in the invasion of *Serratia* bacteria.

CONCLUSIONS: The results obtained suggest that the interaction of bacteria with eukaryotic cells induces the expression of caveolin-1, which leads to a change plasma membrane components mobility. This may be due to the fact that β 1-integrin is involved in the invasion of the studied bacteria, which should be stabilized at the plasma membrane upon binding of the ligand due to the formation of a cholesterol- and sphingolipid-rich membrane microenvironment.

Keywords: bacterial invasion; *Serratia*; nystatin; plasma membrane; TLR.

Обоснование

В современном мире несмотря на большое разнообразие антимикробных препаратов вероятность возникновения бактериальной инфекции остается на высоком уровне. По данным Всемирной организации здравоохранения (доклад от 01.2022) показатели, полученные за последнее десятилетие, свидетельствуют о значительной распространенности внутрибольничных инфекций, многие из которых вызваны микроорганизмами с множественной лекарственной устойчивостью. При этом развитие патологического процесса может включать как тканевую (межклеточную) инвазию микроорганизмов, так и проникновение внутрь клеток, не являющихся профессиональными фагоцитами. Попадание микроорганизмов в клетки организма-хозяина обеспечивает им защиту не только от антибактериальных препаратов, но и от иммунной системы макроорганизма. После интернализации микроорганизмы могут оставаться неактивными и персистировать, вызывая рецидивирующие инфекции и хронические заболевания [1].

Способность проникать в эпителиальные клетки организма-хозяина является важным фактором вирулентности многих патогенных бактерий. Однако инвазировать могут не только патогенные, но и условно-патогенные бактерии, например, *Serratia marcescens* (при внутрибольничных инфекциях главным образом поражает мочевыводящие пути) [2]. Было показано, что и другие представители рода *Serratia* — *S. grimesii* и *S. proteamaculans* — также способны к инвазии в эпителиальные клетки [3, 4]. Исследование механизмов инвазии важно

не только для понимания фундаментальных процессов взаимодействия бактериальных и эукариотических клеток, но и для оценки эффективности уже существующих и разработки новых противомикробных препаратов.

Плазматическая мембрана клетки представляет собой первый барьер на пути проникновения бактерии в эпителиальную клетку, микроорганизмы активно используют ее для осуществления процессов адгезии и инвазии в клетку-хозяина. На плазматической мембране эукариотических клеток выделяют микродомены, обогащенные сфинголипидами и холестерином (и, следовательно, менее текучие, чем остальная часть мембраны), — кавеолы и липидные рафты. Кавеолы имеют инвагинированную структуру (за счет белка кавеолина-1), а липидные рафты представляют собой плоские участки мембраны. Как правило, в этих микродоменах могут быть закорены различные белки, участвующие в передаче клеточных сигналов [5]. Интересно, что бактериальные инфекционные агенты могут являться индукторами образования липидных рафтов [6, 7]. Для некоторых бактерий было показано участие кавеол/липидных рафтов в проникновении в эпителиальные клетки [6, 8, 9]. Так, в процессе интернализации *Pseudomonas aeruginosa* было доказано участие липидных рафтов в активации сигнальных путей, приводящих к инвагинации мембраны эпителиоподобных нефагоцитирующих клеток, а также показано непосредственное участие гликофинголипидов — основных компонентов липидных рафтов — в лектин(LecA)-индуцированной инвазии *P. aeruginosa* [10].

Сообщалось, что нистатин (полиеновый антибиотик, за счет наличия двойных связей имеет высокую тропность к стеролам клеточной мембраны) ингибирует кавеолин-зависимый эндоцитоз [11, 12], но не влияет на клатрин-зависимый эндоцитоз [13]. Нистатин способен связываться с холестерином и извлекать его из плазматических мембран эукариотических клеток, что приводит к уплощению кавеол и разрушению липидных рафтов [14].

Цель исследования — с помощью нистатина проверить, участвуют ли кавеолы/липидные рафты в инвазии бактерий *S. grimesii* и *S. proteamaculans* в нефагоцитирующие эпителиоподобные клетки Caco-2 и M-HeLa.

Материалы и методы

1. Бактериальные штаммы и условия культивирования.

S. grimesii штамм 30063 был получен из Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSM 30063). *S. proteamaculans* штамм 94 был любезно предоставлен И.В. Демидюком (Институт молекулярной генетики РАН). Бактерии выращивали в среде Лурия – Бергана (LB, Диаэм, Россия) в течение 24 ± 2 ч при интенсивном перемешивании и температуре культивирования 37°C (*S. grimesii*) или 30°C (*S. proteamaculans*). Для оценки количества колониеобразующих единиц (КОЕ/мл) спектрофотометрически измеряли оптическую плотность бактериальной суспензии при длине волны 600 нм с последующим разведением и высевом на чашки Петри с LB-агаром по Miller (Диаэм, Россия). Объем бактериальной суспензии, соответствующий множественности заражения (МОИ) 100 КОЕ на клетку, центрифугировали в течение 10 мин при скорости 13 000 об/мин, супернатант удаляли, бактериальный осадок ресуспендировали в DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Биолот, Россия).

2. Культуры клеток и условия культивирования.

Клеточные линии M-HeLa (эпителиоидная карцинома шейки матки человека) и Caco-2 (аденокарцинома ободочной кишки человека) были получены из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН). Клетки растили в среде DMEM в присутствии 10 % фетальной бычьей сыворотки (Gibco, Австралия) без добавления антибиотиков при температуре 37°C , 5 % CO_2 . Для проведения экспериментов клетки трипсинизировали (раствор Трипсина – Версена, Биолот, Россия), рассеивали в 24-луночные планшеты в количестве 100–200 тыс. клеток на лунку и инкубировали в течение 24–48 ч до 70–95 % конфлюэнтности. Подсчет клеток осуществляли в камере Горяева с помощью трипанового синего (Биолот, Россия).

Перед инкубацией с нистатином (суспензия в DPBS — фосфатно-солевом растворе Дульбекко, Sigma-Aldrich, США) эпителиальные клетки дважды отмывали фосфатно-солевым буфером (PBS) pH 7.4 (Биолот, Россия), а затем добавляли 50 мкМ (205 Ед) нистатина в среде DMEM (без сыворотки и антибиотиков) или аналогичное количество раствора Дульбекко (DPBS, Биолот, Россия) и инкубировали в течение 1 ч при 37°C и 5 % CO_2 . После этого клетки 2 раза отмывали PBS и вносили 500 мкл DMEM (без сыворотки и антибиотиков) или 0,05 % Tween20 (Sigma-Aldrich, США) в среде DMEM (без сыворотки и антибиотиков). Далее добавляли бактерии, как описано в методе количественной инвазии.

3. Метод количественной оценки инвазии.

В каждую лунку с эукариотическими клетками добавляли по 100 мкл бактериальной суспензии в среде DMEM в соответствии с МОИ 100 КОЕ на клетку. Планшет центрифугировали в течение 5 мин при скорости 2000 об/мин, а затем инкубировали в течение 2 ч при 37°C , 5 % CO_2 . После этого клетки трижды отмывали PBS, трипсинизировали и добавляли равный объем среды DMEM, содержащей 100 мкг/мл гентамицина (Биолот, Россия), и инкубировали в течение 1,0–1,5 ч — для элиминации неинвазивных внеклеточных бактерий. Затем клетки лизировали добавлением 4,5 % раствора дезоксихолата натрия (Applichem, Германия) к клеточной суспензии в соотношении 1 : 2. Далее делали 10-кратные разведения аликвот лизатов в среде LB и высевали на LB-агар. Чашки с посевами инкубировали в течение 48 ч при комнатной температуре, после чего осуществляли подсчет выросших колоний. Полученное значение КОЕ (с учетом разведений) соответствует числу инвазивных бактерий.

Все эксперименты проводили не менее 4 раз, по 3 повторности в каждом эксперименте. Значения, полученные в контрольных образцах, принимали за 100 %. Статистическую обработку проводили в программах SigmaPlot 12.0 (США) и Microsoft Excel 2010 (США). Данные представлены в виде $M \pm SE$ (средние значения и стандартные отклонения). Для оценки различий применяли *t*-критерий Стьюдента, различия считали достоверными при $p < 0,05$.

4. Конфокальная микроскопия.

Клетки Caco-2 и M-HeLa, выращенные на стеклах, инкубировали с нистатином в течение 1 ч при 37°C и 5 % CO_2 . Затем клетки на стеклах отмывали раствором PBS, фиксировали в 4 % растворе формальдегида (Sigma-Aldrich, США) в течение 15 мин при комнатной температуре. Окраску липидных рафтов с использованием субъединицы В холерного токсина,

конъюгированной с флуоресцентной меткой Alexa488 (Sigma-Aldrich, Германия), проводили без предварительной пермеабиллизации в течение 15 мин при температуре 4 °С. Для окраски клеток антителами проводили пермеабиллизацию клеточной мембраны 0,1 % раствором Triton X-100 (Helicon, Россия) в течение 10 мин при комнатной температуре. Неспецифическое связывание антител блокировали с помощью 1 % раствора бычьего сывороточного альбумина (Helicon, Россия) в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее добавляли антитела к α -тубулину в разведении 1:1000 (#T5168, Sigma-Aldrich, США) или кавеолину-1 в разведении 1:1000 (#GB11409, Servicebio, Китай) и инкубировали препараты клеток при 4 °С в течение 16–18 ч после чего добавляли антивидовые антитела, конъюгированные с AlexaFluor488 1:500 (#sc-2010, Santa Cruz Biotechnology, США) или AlexaFluor555 1:1000 (#ab150078, Abcam, США) и инкубировали в темноте в течение 1 ч при комнатной температуре. В качестве отрицательного контроля использовали клетки, окрашенные только антивидовыми антителами. F-актин цитоскелета окрашивали раствором родамин-фаллоидина (Invitrogen, США) в течение 15 мин при 37 °С, для визуализации клеточных ядер препараты окрашивали раствором 4,6-диамино-2-фенилиндол дигидрохлорида (DAPI, Sigma-Aldrich, Германия). Препараты анализировали с помощью микроскопа Olympus FV3000 (Olympus, Япония) при длинах волн 405, 488 и 561 нм.

5. Вестерн-блоттинг.

Эукариотические клетки прединкубировали с 50 мкмоль/л нистатина или DPBS в течение 1 ч при 37 °С и 5 % CO₂. Затем удаляли среду и добавляли краску для подготовки проб, содержащую 2-меркаптоэтанол, прогревали в течение 5 мин при 56 °С. После этого пробы прогревали в течение 5 мин при 98 °С.

Белки разделяли при помощи электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях, в качестве маркеров молекулярной массы использовали предокрашенные белки (#26619, BioRad, США). Затем белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану 0,45 мкм (Bio-Rad, Германия) полусухим методом. Неспецифическое связывание блокировали 3 % раствором сухого обезжиренного молока (Serva, Германия) в 0,05 % растворе Tween20 в PBS. После переноса мембрану разрезали и соответствующие части инкубировали либо с кроличьими антителами к кавеолину-1 (#GB11409, Servicebio, Китай) в разведении 1:800, либо с мышинными антителами к β -актину (#GB15001, Servicebio, Китай) в разведении 1:1000. Разведения в течение 2 ч при комнатной

температуре. Мембраны отмывали 0,05 % раствором Tween20 в PBS и инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, против иммуноглобулина мыши (#ab97023, Abcam, США) или кролика (#31460, Thermo Fisher Scientific, США) в разведении 1:20 000 в течение 1 ч при комнатной температуре. Сигнал детектировали с помощью реагентов для хемилюминесценции SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific, США) на приборе ChemiDoc Imaging Systems (Bio-Rad, США).

6. Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР) в реальном времени.

После предварительной инкубации с 50 мкмоль/л нистатина или DPBS и бактериями эпителиальные клетки 3 раза отмывали PBS и трипсинизировали 0,25 % раствором Трипсина – Версена. Затем клетки осаждали центрифугированием при 1500 об/мин в течение 10 мин, супернатант удаляли. Тотальную РНК выделяли из полученного осадка с использованием набора для выделения РНК из культур клеток *diaGene* (Диаэм, Россия). Обратную транскрипцию и амплификацию проводили с помощью BioMaster ОТ-ПЦР SYBR Blue (Биолабмикс, Россия) на приборе CFX96 Touch (Bio-Rad, США). Этапы включали первоначальный синтез кДНК при 45 °С в течение 30 мин, денатурацию при 95 °С в течение 5 мин и 40 циклов амплификации (95 °С в течение 30 с, 60 °С в течение 30 с, 72 °С в течение 30 с). Каждый образец анализировали в четырех повторностях не менее 2 раз. Праймеры (прямой и обратный соответственно) к *tlr2*: CTGGACAATGCCACATAC, СТААТGТАGГТGATCCTG; *tlr4*: CAGAАCTG CAGGTGCTGG, GTTCTCTAGAGATGCTAG; *beta-actin*: GCCGGGACCTGACTGACTAC, TTTCCTTAATGTACGCACGAT. Результаты ПЦР-анализа интерпретировали методом $\Delta\Delta CT$, основанным на оценке уровня экспрессии целевого гена по отношению к референсному (β -актин).

Результаты

1. Секвестрация холестерина с помощью нистатина приводит к уменьшению инвазии бактерий за счет увеличения экспрессии кавеолина-1.

Поскольку было обнаружено, что кавеолы/липидные рафты участвуют в инвазии и межклеточном распространении многих патогенных и условно-патогенных бактерий [15, 16], мы задались вопросом, участвуют ли кавеолы/липидные рафты в интернализации бактерий *S. grimesii* и *S. proteamaculans* в эпителиальные клетки. Предварительная часовая инкубация клеток Caco-2 с 50 мкмоль нистатина не влияла на инвазию обоих видов бактерий *Serratia*

в данные клетки (рис. 1). При этом увеличение концентрации нистатина в 4 раза также не оказывало влияния на инвазию исследуемых бактерий в клетки аденокарциномы ободочной кишки (данные не представлены). При обработке нистатином клеток М-HeLa наблюдалось ингибирование инвазии исследуемых бактерий примерно на 30 %. Данные результаты могут говорить о том, что при проникновении в клетки М-HeLa бактерии *S. grimesii* и *S. proteamaculans* используют кавеолы и/или липидные рафты.

Экспрессия кавеолина-1 может модулировать подвижность белков, связанных с кавеолами, приводя к изменению текучести плазматической мембраны [17]. Поскольку на конфокальных микрофотографиях не была обнаружена однозначная колокализация бактерий и кавеолина-1 (рис. 2), мы исследовали, связан ли ингибирующий инвазию эффект нистатина с изменением экспрессии кавеолина-1 и текучести плазматической мембраны клеток М-HeLa. Методом вестерн-блоттинга (рис. 3, а) мы показали, что в клетках Caco-2 кавеолин-1 не экспрессируется, что соответствует литературным данным [18], в то время как цитоплазматическая мембрана клеток М-HeLa содержит кавеолы, и количество кавеолина-1 после инкубации с нистатином увеличивается в 1,5 раза. Таким образом, можно предположить, что обработка клеток М-HeLa нистатином приводит к изменению (вероятно, уменьшению) текучести клеточной мембраны за счет увеличения экспрессии кавеолина-1. Чтобы увеличить текучесть мембраны, клетки сначала прединкубировали с 50 мкмоль/л нистатина в течение 1 ч, а затем добавляли среду, содержащую 0,05 % Tween20 [19]. После этого клетки инфицировали исследуемыми бактериями и измеряли

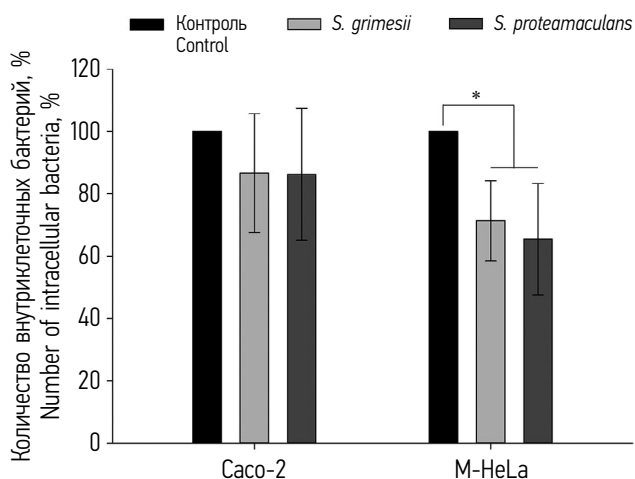


Рис. 1. Количество внутриклеточных бактерий в клетках Caco-2 и М-HeLa, предварительно инкубированных с 50 мкмоль/л нистатина в течение 1 ч, относительно контрольных клеток, прединкубированных с фосфатно-солевым раствором Дульбекко (контроль). Показаны средние значения и стандартные отклонения. * $p < 0,05$

Fig. 1. The number of intracellular bacteria in Caco-2 and M-HeLa cells preincubated with 50 μM nystatin for 1 h relative to control cells preincubated with DPBS (control). Means and standard deviations are shown. * $p < 0.05$

инвазию. Добавление детергента не влияло на жизнеспособность эукариотических клеток, а также на жизнеспособность и скорость роста бактерий. Как показано на рис. 3, b, в присутствии Tween20 инвазия в контрольные клетки, прединкубированные с DPBS, не менялась, а количество внутриклеточных бактерий в клетках, обработанных нистатином, увеличивалось в 1,6 раза (по сравнению с контролем). Данные результаты позволяют предположить, что различия в эффективности инвазии бактерий *S. grimesii* и *S. proteamaculans* в клетки Caco-2 и М-HeLa

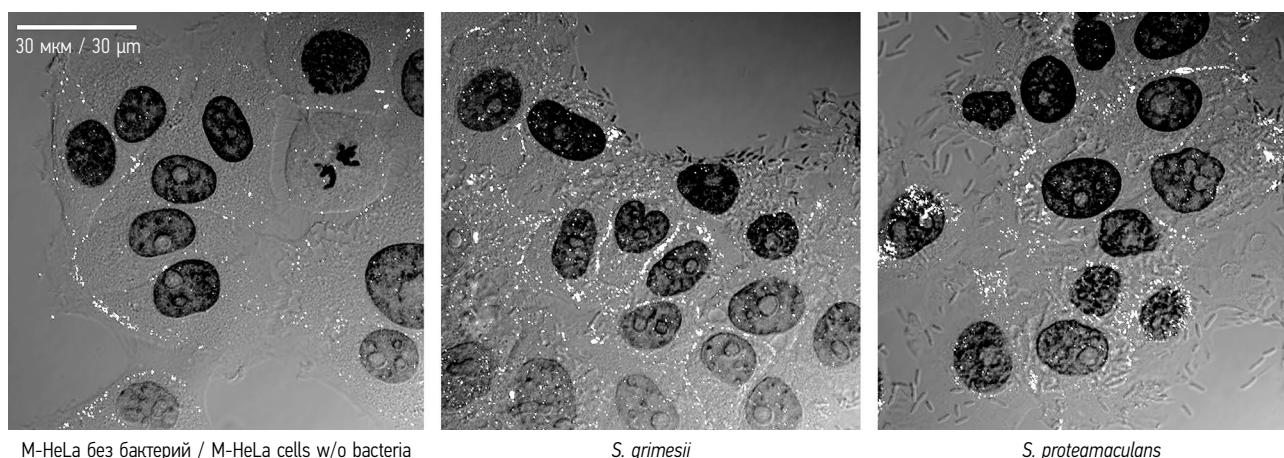


Рис. 2. Конфокальная флуоресцентная микроскопия клеток М-HeLa без бактерий и после двухчасовой инкубации с *S. grimesii* и *S. proteamaculans*. Ядра окрашены 4,6-диамино-2-фенилиндолом (черный), кавеолин — непрямая иммунофлуоресценция (белый)

Fig. 2. Confocal fluorescence microscopy of M-HeLa cells without bacteria and after 2-h incubation with *S. grimesii* or *S. proteamaculans*. Nuclei are stained with DAPI (black), caveolin — indirect immunofluorescence (white)

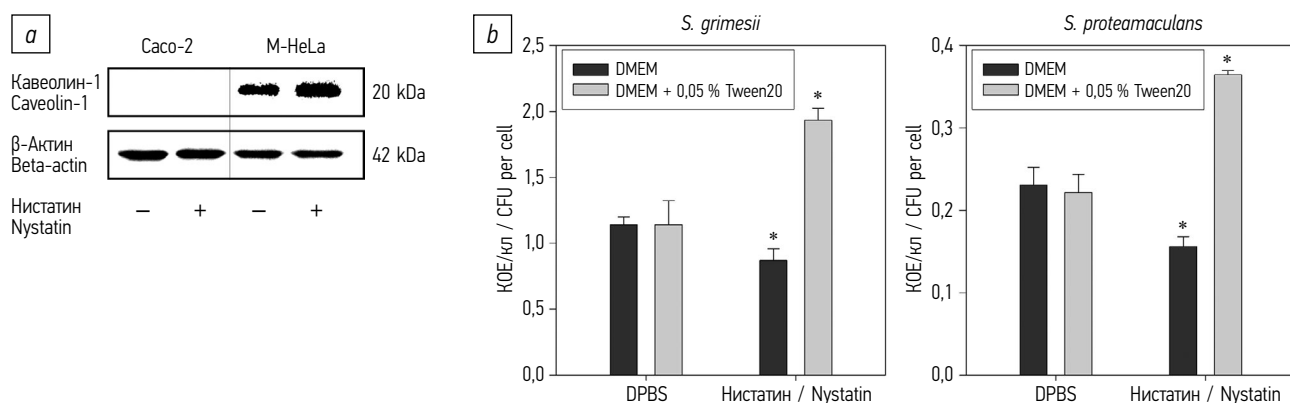


Рис. 3. Экспрессия кавеоллина-1 в клетках Caco-2 и M-HeLa, предварительно инкубированных с 50 мкмоль/л нистатина (+) или фосфатно-солевым раствором Дульбекко (–), детектирована с помощью вестерн-блоттинга (a). Количество внутриклеточных бактерий, приходящихся на 1 клетку M-HeLa, которые предварительно инкубировали с 50 мкмоль/л нистатина или фосфатно-солевым раствором Дульбекко (контроль), после чего к ним добавляли бактерии в среде DMEM или DMEM, содержащей 0,05 % Tween20. Показаны средние значения и стандартные отклонения. * $p < 0,05$ (относительно соответствующих контрольных образцов) (b).

Fig. 3. The protein level of caveolin-1 in Caco-2 and M-HeLa cells treated with 50 μ M nystatin (+) or DPBS (–) was detected by western blot analysis assays (a). The number of intracellular bacteria per M-HeLa cell preincubated with 50 μ M nystatin or DPBS (control), after that bacteria were added in DMEM or DMEM containing 0,05% Tween20. Means and standard deviations are shown. * $p < 0.05$ (relative to corresponding control samples) (b)

связаны с разницей в свойствах плазматических мембран клеток карцином.

2. Нистатин не влияет на сборку липидных рафтов, а также не приводит к перестройкам цитоскелета.

Как известно, нистатин имеет большую тропность к эргостеролу, чем к холестерину, однако было показано, что он может изолировать или удалять холестерин из липидных рафтов [20–22]. Чтобы оценить влияние нистатина на состояние липидных рафтов, клетки окрашивали субъединицей В холерного токсина, конъюгированного с флуоресцентной меткой Alexa488 (СТхВ-FITC), поскольку связывание СТхВ с ганглиозидом GM1 является маркером для идентификации липидных рафтов. На рис. 4 показано,

что обработка клеток 50 мкмоль/л нистатина не ингибировала клеточное поглощение маркера (в контрольные образцы добавляли соответствующее количество DPBS).

Ранее нами было показано, что предварительная двухчасовая обработка клеток M-HeLa и Caco-2 метил- β -циклодекстрином, который специфически удаляет холестерин из плазматической мембраны и нарушает формирование липидных рафтов, приводила к увеличению количества стресс-фибрилл в клетках [23]. Поэтому мы проверили влияние нистатина на реорганизацию цитоскелета клеток карцином (рис. 5).

Инкубация клеток с нистатином не приводит к реорганизации актиновых микрофиламентов

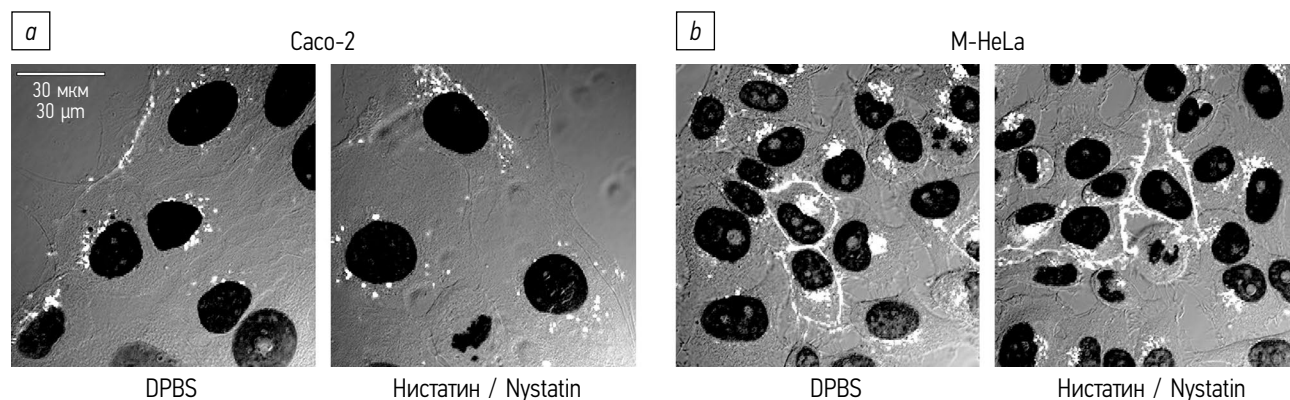


Рис. 4. Конфокальная флуоресцентная микроскопия липидных рафтов. Изображение клеток Caco-2 (a) и M-HeLa (b), инкубированных с 50 мкмоль/л нистатина при 37 °C в течение 1 ч. GM1 окрашивали СТхВ-FITC (белый), ядра клеток окрашены 4,6-диамино-2-фенилиндолом (черный)

Fig. 4. Confocal fluorescence microscopy: monitoring of lipid rafts distribution. Caco-2 (a) and M-HeLa (b) cells incubated with 50 μ M nystatin at 37 °C for 1 hour. GM1 was stained with CTxB-FITC (white), cell nuclei were stained with DAPI (black)

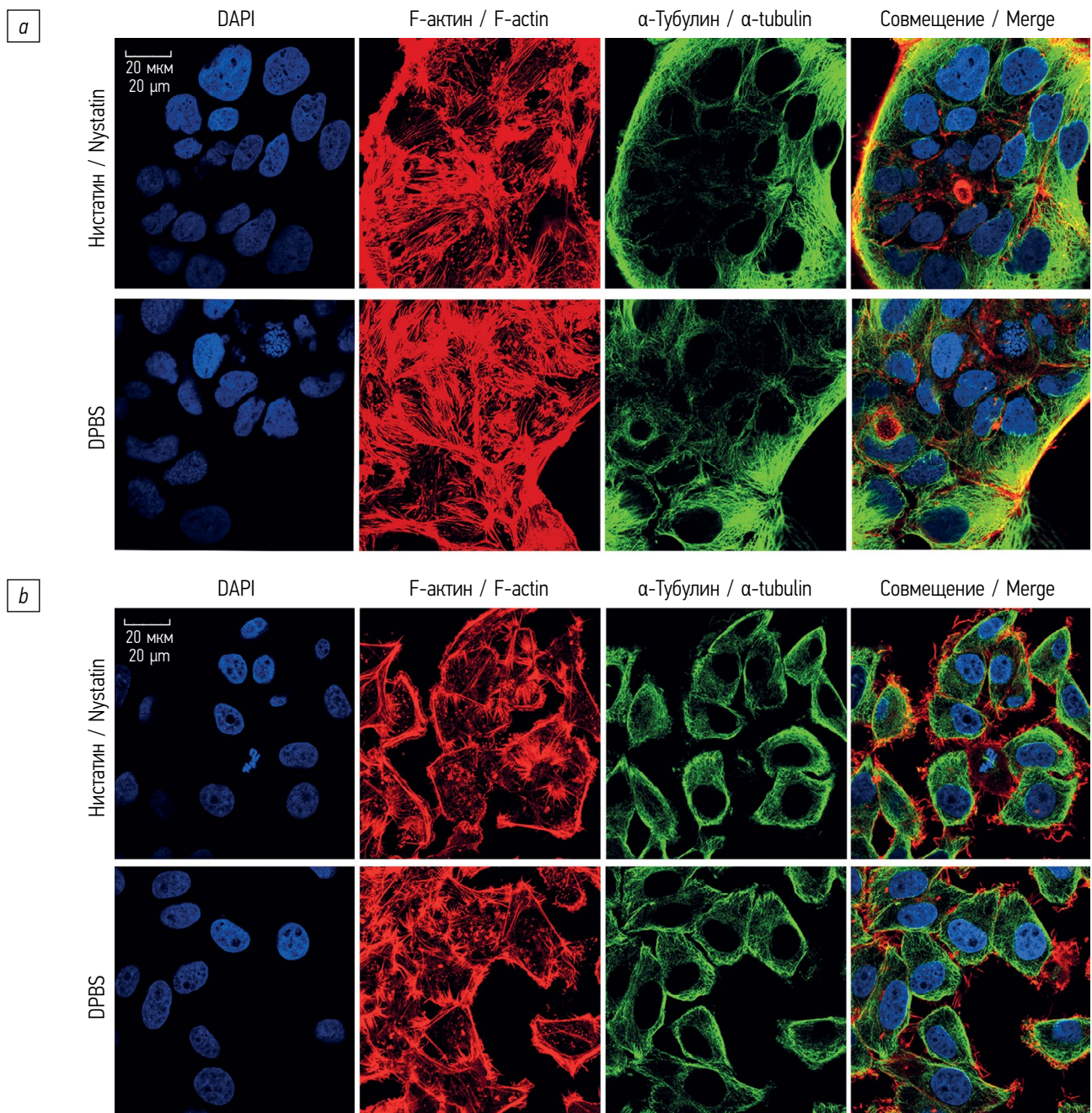


Рис. 5. Конфокальная флуоресцентная микроскопия клеток Caco-2 (a) и M-HeLa (b), визуализирующая цитоскелет эпителиальных клеток, обработанных 50 мкмоль/л нистатина или фосфатно-солевого раствора Дульбекко в течение 1 ч. Ядра окрашены 4,6-диамино-2-фенилиндолом (синий), F-актин окрашен RF (красный), α -тубулин — непрямая иммунофлуоресценция (зеленый)

Fig. 5. Visualization the cytoskeleton of Caco-2 (a) and M-HeLa (b) cells treated with 50 μ M nystatin or DPBS for 1 h by confocal fluorescence microscopy. Nuclei are stained with DAPI (blue), F-actin is stained with RF (red), α -tubulin is indirect immunofluorescence (green)

и микротрубочек цитоскелета ни в клетках Caco-2, ни в клетках M-HeLa.

3. Агонистическая и антагонистическая активность нистатина в отношении Toll-подобных рецепторов является клеточно-специфической.

В плазматической мембране эпителиальных клеток, в том числе HeLa и Caco-2 [24, 25], присутствуют рецепторы распознавая паттер-

нов, например, Toll-подобные рецепторы (TLR), которые распознают различные микробные структурные компоненты. Так, TLR2 реагирует на липопротеины и пептидогликан, а TLR4 активируется липополисахаридами (ЛПС) наружной мембраны грамотрицательных бактерий. Молекулы ЛПС распознаются CD14 и переносятся в комплекс MD2–TLR4 перед акти-

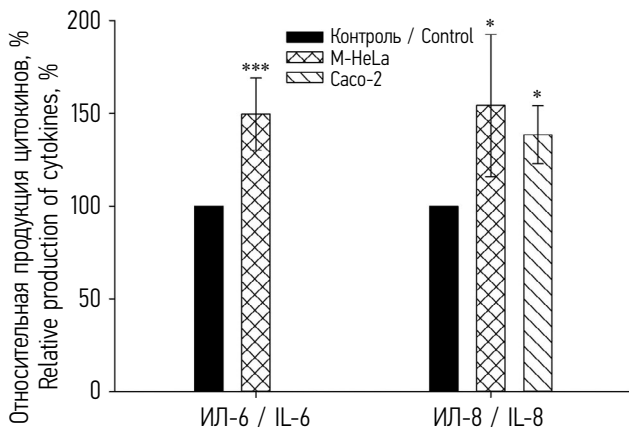


Рис. 6. Относительная продукция цитокинов — интерлейкинов-6 и -8 клетками М-HeLa и Caco-2 после часовой инкубации с 50 мкмоль/л нистатина. К контрольным клеткам добавляли соответствующее количество фосфатно-солевого раствора Дульбекко. Показаны средние значения и стандартные отклонения. Статистически значимые различия между контрольной и обработанной группами отмечены звездочками: * $p < 0,05$, *** $p < 0,005$

Fig. 6. Relative production of cytokines IL-6 and IL-8 by M-HeLa and Caco-2 cells after one-hour incubation with 50 μM nystatin, DPBS was added to control cells. Means and standard deviations are shown. Statistically significant differences between the control and treated groups are indicated by asterisks: * $p < 0.05$, *** $p < 0.005$

вазией TLR4, и часть комплекса ЛПС—MD2—TLR4 попадает в клетку путем эндоцитоза [26]. Установлено, что как TLR2, так и TLR4 и вспомогательные белки, а также стимулированный комплекс ЛПС—MD2—TLR4 ассоциируются с липидными рафтами/кавеолами [27, 28]. И ве-

роятно, это необходимое условие для опосредованной TLR передачи сигнала и экспрессии генов-мишеней [29, 30].

Сообщалось, что нистатин ингибирует индуцированную ЛПС активацию NF- κB и экспрессию генов, кодирующих иммуномодулирующие цитокины [29]. В то же время имеются работы, согласно которым нистатин проявляет TLR2- и TLR4-агонистическую активность [31] и стимулирует секрецию интерлейкина-8 (ИЛ-8) в TLR2 экспрессирующих клетках [32]. В связи с этим мы решили исследовать влияние нистатина на продукцию провоспалительных цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-8 клетками М-HeLa и Caco-2. Как показано на рис. 6, добавление 50 мкмоль/л нистатина приводило к увеличению продукции цитокинов в 1,5 раза (в клетках Caco-2 ИЛ-6 не детектируется).

Поскольку нистатин может проявлять как агонистическую, так и антагонистическую активность в отношении TLR2 и TLR4, мы сравнили его влияние на экспрессию генов, кодирующих данные рецепторы (рис. 7, а). В зависимости от клеточной линии нистатин либо увеличивал (Caco-2), либо уменьшал (M-HeLa) экспрессию *tlr2* и *tlr4*.

TLR4 активируется ЛПС грамотрицательных бактерий, чтобы индуцировать выработку провоспалительных медиаторов, направленных на уничтожение бактерий. Для уropатогенных *Escherichia coli* было показано, что уменьшение их интернализации связано с увеличением экспрессии TLR4, что приводит к уменьшению количества фосфорилированной формы малой

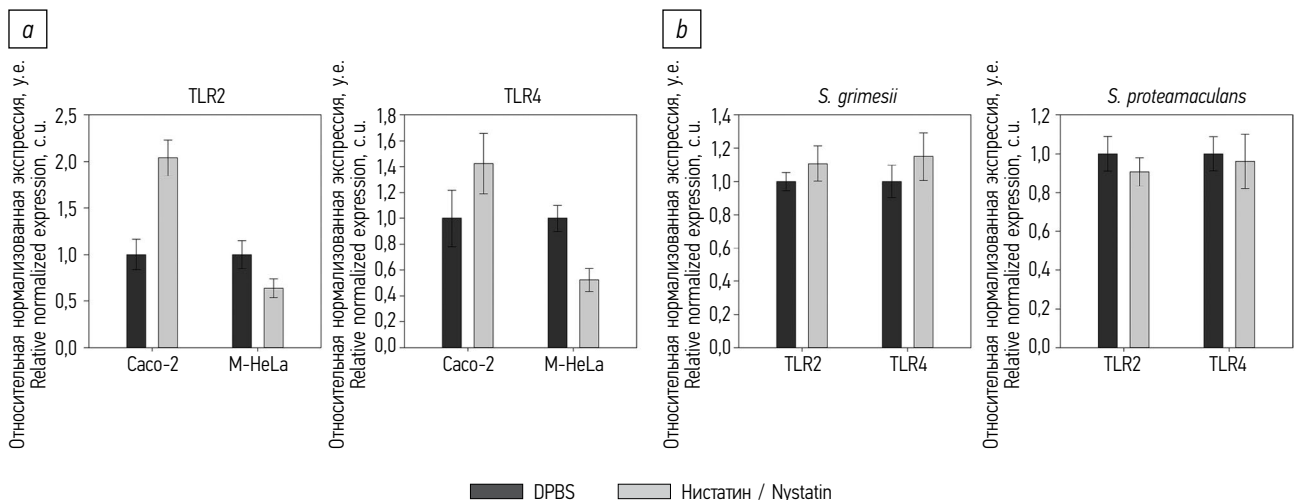


Рис. 7. Относительная нормализованная (на β -актин) экспрессия генов, кодирующих TLR2 и TLR4. Клетки Caco-2 и M-HeLa инкубировали с 50 мкмоль/л нистатина или DPBS (контроль) в течение 1 ч (а). Клетки M-HeLa инкубировали с 50 мкмоль/л нистатина или фосфатно-солевым раствором Дульбекко (контроль) в течение 1 ч, а затем проводили бактериальную инвазию (множественность заражения 100) (б)

Fig. 7. Relative normalized (to β -actin) expression of *tlr2* and *tlr4* genes. Caco-2 and M-HeLa cells were incubated with 50 μM nystatin or DPBS (control) for 1 h (a). M-HeLa cells were incubated with 50 μM nystatin or DPBS (control) for 1 h, and then bacterial invasion was performed (MOI 100) (b)

ГТФазы Rac-1, участвующей в инвазии данных бактерий [33]. В нашей работе обработка клеток М-HeLa нистатином привела к уменьшению инвазии *S. grimesii* и *S. proteamaculans*, и можно было ожидать, что это будет сопровождаться увеличением экспрессии *tlr4*. Однако экспрессия как *tlr4*, так и *tlr2* уменьшилась после добавления антибиотика. В связи с этим мы проверили влияние *S. grimesii* и *S. proteamaculans* на экспрессию *tlr4* и *tlr2* в контрольных и обработанных нистатином клетках М-HeLa (рис. 7, b). Инвазия бактерий повышала уровень экспрессии генов в обработанных клетках до уровня в контрольных образцах. Полученные результаты говорят о том, что TLR4, TLR2 и нижестоящие сигнальные молекулы не принимают активного участия в инвазии исследуемых бактерий.

Обсуждение

Плазматическая мембрана клетки задействована во многих биохимических процессах, и от ее состава зависит не только структура, но и функции клетки. Так, изменение в распределении фосфолипидов в липидном бислое может быть сигналом таких процессов, как агрегация клеток, адгезия и апоптоз. Холестерин является важным структурным компонентом клеточной мембраны и участвует в обеспечении ее целостности и текучести, а также компартментализации и сигнализации [34].

Многие бактерии, способные к инвазии, используют липидные рафты для проникновения в клетку-хозяина. При этом мембранный холестерин играет важную роль во взаимодействии хозяин – патоген. Истощение или секвестрация холестерина снижает адгезию и интернализацию микроорганизмов в эукариотические клетки. Таким образом, холестерин плазматической мембраны может играть двойную роль в процессе бактериальной инвазии: как место связывания бактерий и как интегрирующий компонент липидных рафтов, обеспечивающий платформу для эффективной инициации сигнальных каскадов [35].

Соотношение фосфолипидов и холестерина в клеточной мембране зависит от типа клеток. Ранее мы показали, что истощение холестерина метил- β -циклодекстрином способствует более эффективному уменьшению инвазии бактерий *S. grimesii* и *S. proteamaculans* в клетки М-HeLa, чем в клетки Caco-2 [23]. Такой эффект в том числе может быть связан с тем, что в цитоплазматической мембране клеток Caco-2 содержится холестерина меньше, чем в HeLa, а также не экспрессируется кавеолин-1, который играет важную роль в гомеостазе холестерина, связывая его и транспортируя к мембране [18].

Патогенные бактерии и вирусы используют различные эндоцитарные пути и рецепторы для проникновения в клетку-хозяина. Отрицательно заряженные частицы, в том числе бактерии, могут проникать в клетку с помощью кавеолин-зависимого эндоцитоза [36]. Одним из ингибиторов кавеолин-зависимого эндоцитоза является нистатин. Нистатин способен формировать поры в клеточной мембране, количество которых находится в прямой корреляции с концентрацией нистатина, при этом низкие концентрации антибиотика (50 мкмоль/л) не оказывают существенного влияния на размер и форму клеток [37]. Нистатин также может связывать холестерин, расположенный на плазматической мембране эукариотических клеток, и изменять микроструктуру липидных рафтов, которые играют важную роль не только в интернализации патогенов, но и в регуляции как врожденных, так и адаптивных иммунных реакций [38]. В данной работе мы показали, что нистатин не влияет на распределение холестерина в клетках, но увеличивает продукцию цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-8 в клетках М-HeLa и Caco-2. Антибиотик индуцирует секрецию провоспалительных цитокинов посредством TLR2-зависимого механизма [32]. Синтез цитокинов эпителиальными клетками в ответ на бактериальное заражение также опосредован сигнальными путями, запускаемыми Toll-подобными рецепторами, в том числе TLR2 и TLR4. Передача сигнала от TLR4 может приводить к активации транскрипционного фактора NF- κ B, или запускать альтернативный сигнальный путь, который приводит к увеличению продукции вторичного мессенджера — циклического аденозинмонофосфата. Накопление циклического аденозинмонофосфата способствует инактивации малой Rho-ГТФазы Rac1, которая участвует в проникновении бактерий через липидные рафты. Таким образом, увеличение экспрессии TLR4 приводит к уменьшению бактериальной инвазии [33]. Мы показали, что заражение предварительно обработанных нистатином клеток М-HeLa бактериями *S. grimesii* и *S. proteamaculans* приводит к увеличению экспрессии как *tlr2*, так и *tlr4*. Однако уровень экспрессии данных генов в обработанных антибиотиком клетках не превосходит уровень в контрольных образцах. Поэтому мы не можем однозначно говорить об участии Toll-подобных рецепторов в инвазии исследуемых бактерий.

Интернализация бактерий в эукариотические клетки зависит от текучести плазматической мембраны, которая зависит от содержания в ней холестерина [10]. При этом в одних работах говорится о том, что уменьшение уровня холестерина в клеточной мембране за счет сверхэкспрессии кавеолина-1 приводит к увеличению текучести

мембраны [39], в других, наоборот, нокдаун кавеолина-1 увеличивает текучесть плазматической мембраны и подвижность белков мембранных микродоменов [40]. Дефицит кавеолина-1 в эукариотических клетках может способствовать как увеличению, так и уменьшению количества внутриклеточных бактерий. Это связано с перераспределением различных компонентов липидных рафтов в процессе кластеризации задействованных в интернализации бактерий рецепторов. Так, во время инвазии *L. monocytogenes* нокдаун кавеолина-1 нарушает рекрутирование E-кадгерина в места прикрепления бактерий [41]. При адгезии на поверхности эукариотических клеток бактерий *S. aureus* наблюдается перераспределение компонентов мембранных микродоменов и рекрутирование ганглиозида GM1 к местам прикрепления бактерий, зависящее от $\beta 1$ -интегрин клетки-хозяина, при этом кластеризация самого рецептора не зависит от мембранных микродоменов. Однако инвазия бактерий зависит от состава микродоменов, и дефицит кавеолина-1 увеличивает опосредованное $\beta 1$ -интегрином поглощение *S. aureus* [40]. Ранее мы показали, что *S. proteamaculans* также задействуют $\beta 1$ -интегрин при инвазии в эпителиальные клетки [42]. Таким образом, можно предположить, что кавеолин-1 способен ограничивать интернализацию бактерий, связывающихся с $\beta 1$ -интегрином, а модуляция подвижности компонентов мембранных микродоменов является важным аспектом взаимодействия патоген – хозяин во время инвазии бактерий.

Выводы

Полученные результаты позволяют предположить, что уменьшение инвазии бактерий *S. grimesii* и *S. proteamaculans* в эпителиальные клетки, предварительно обработанные нистатином, связано с изменением (вероятно, уменьшением) текучести плазматической мембраны. Данный эффект может быть характерен для бактерий, в интернализации которых участвует $\beta 1$ -интегрин.

Дополнительная информация

Источник финансирования. Исследовательская работа не имела спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Additional information

Funding source. The research had no sponsorship.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Список литературы

1. Buccini D.F., Cardoso M.H., Franco O.L. Antimicrobial peptides and cell-penetrating peptides for treating intracellular bacterial infections // *Front Cell Infect Microbiol.* 2020. Vol. 10. P. 612931. doi: 10.3389/fcimb.2020.612931
2. Khanna A., Khanna M., Aggarwal A. *Serratia marcescens* – a rare opportunistic nosocomial pathogen and measures to limit its spread in hospitalized patients // *J Clin Diagn Res.* 2013. Vol. 7, N 2. P. 243–246. doi: 10.7860/JCDR/2013/5010.2737
3. Bozhokina E.S., Tsaplina O.A., Efremova T.N., et al. Bacterial invasion of eukaryotic cells can be mediated by actin-hydrolysing metalloproteases grimeysin and protealysin // *Cell Biol Int.* 2011. Vol. 35, N 2. P. 111–118. doi: 10.1042/CBI20100314
4. Efremova T., Ender N., Brudnaja M., et al. Specific invasion of transformed cells by *Escherichia coli* A2 strain // *Cell Biol Int.* 2001. Vol. 25, N 6. P. 557–561. doi: 10.1006/cbir.2001.0670
5. de Laurentiis A., Donovan L., Arcaro A.L. Lipid rafts and caveolae in signaling by growth factor receptors // *Open Biochem J.* 2007. Vol. 1. P. 12–32. doi: 10.2174/1874091X00701010012
6. Bagam P., Singh D.P., Inda M.E., Batra S. Unraveling the role of membrane microdomains during microbial infections // *Cell Biol Toxicol.* 2017. Vol. 33, N 5. P. 429–455. doi: 10.1007/s10565-017-9386-9
7. Monjarás Feria J., Valvano M.A. An overview of anti-eukaryotic T6SS effectors // *Front Cell Infect Microbiol.* 2020. Vol. 10. P. 584751. doi: 10.3389/fcimb.2020.584751
8. Machado F.S., Rodriguez N.E., Adesse D., et al. Recent developments in the interactions between caveolin and pathogens // *Adv Exp Med Biol.* 2012. Vol. 729. P. 65–82. doi: 10.1007/978-1-4614-1222-9_5
9. Konkel M.E., Samuelson D.R., Eucker T.P., et al. Invasion of epithelial cells by *Campylobacter jejuni* is independent of caveolae // *Cell Commun Signal.* 2013. Vol. 11. P. 100. doi: 10.1186/1478-811X-11-100
10. Eierhoff T., Bastian B., Thuenauer R., et al. A lipid zipper triggers bacterial invasion // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014. Vol. 111, N 35. P. 12895–12900. doi: 10.1073/pnas.1402637111
11. Ishii M., Fukuoka Y., Deguchi S., et al. Energy-dependent endocytosis is involved in the absorption of indomethacin nanoparticles in the small intestine // *Int J Mol Sci.* 2019. Vol. 20, N 3. P. 476. doi: 10.3390/ijms20030476
12. Kruger K., Schrader K., Klempt M. Cellular response to titanium dioxide nanoparticles in intestinal epithelial Caco-2 cells is dependent on endocytosis-associated structures and mediated by EGFR // *Nanomaterials (Basel).* 2017. Vol. 7, N 4. P. 79. doi: 10.3390/nano7040079
13. Zhu X.D., Zhuang Y., Ben J.J., et al. Caveolae-dependent endocytosis is required for class A macrophage scavenger receptor-mediated apoptosis in macrophages // *J Biol Chem.* 2011. Vol. 286, N 10. P. 8231–8239. doi: 10.1074/jbc.M110.145888
14. Rosello-Busquets C., Hernaiz-Llorens M., Soriano E., Martínez-Mármol R. Nystatin regulates axonal extension and regeneration by modifying the levels of nitric oxide // *Front Mol Neurosci.* 2020. Vol. 13. P. 56. doi: 10.3389/fnmol.2020.00056
15. Tsai Y.H., Chen W.L. Host lipid rafts as the gates for listeria monocytogenes infection: a mini-review // *Front Immunol.* 2020. Vol. 11. P. 1666. doi: 10.3389/fimmu.2020.01666

16. Zaas D.W., Duncan M., Rae Wright J., Abraham S.N. The role of lipid rafts in the pathogenesis of bacterial infections // *Biochim Biophys Acta*. 2005. Vol. 1746, N 3. P. 305–313. doi: 10.1016/j.bbamcr.2005.10.003
17. Chaudhary N., Gomez G.A., Howes M.T., et al. Endocytic cross-talk: caveins, caveolins, and caveolae regulate clathrin-independent endocytosis // *PLoS Biol*. 2014. Vol. 12, N 4. P. e1001832. doi: 10.1371/journal.pbio.1001832
18. Silva L.N.D., Garcia I.J.P., Valadares J.M.M., et al. Evaluation of cardiotoxic steroid modulation of cellular cholesterol and phospholipid // *J Membr Biol*. 2021. Vol. 254, N 5–6. P. 499–512. doi: 10.1007/s00232-021-00203-z
19. Lim J.Y., Barnett T.C., Bastiani M., et al. Caveolin 1 restricts Group A Streptococcus invasion of nonphagocytic host cells // *Cell Microbiol*. 2017. Vol. 19, N 12. doi: 10.1111/cmi.12772
20. Fadeyibi O., Rybalchenko N., Mabry S., et al. The Role of lipid rafts and membrane androgen receptors in androgen's neurotoxic effects // *J Endocr Soc*. 2022. Vol. 6, N 5. P. bvac030. doi: 10.1210/jendso/bvac030
21. Foster L.J., De Hoog C.L., Mann M.C.L. Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003. Vol. 100, N 10. P. 5813–5818. doi: 10.1073/pnas.0631608100
22. Lamberti Y., Alvarez Hayes J., Perez Vidakovic M.L., Rodriguez M.E. Cholesterol-dependent attachment of human respiratory cells by *Bordetella pertussis* // *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2009. Vol. 56, N 2. P. 143–150. doi: 10.1111/j.1574-695X.2009.00557.x
23. Berson Y., Khaitlina S., Tsaplina O. Involvement of lipid rafts in the invasion of opportunistic bacteria *Serratia* into eukaryotic cells // *Int J Mol Sci*. 2023. Vol. 24, N 10. P. 9029. doi: 10.3390/ijms24109029
24. Pridmore A.C., Jarvis G.A., John C.M., et al. Activation of toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4/MD2 by *Neisseria* is independent of capsule and lipooligosaccharide (LOS) sialylation but varies widely among LOS from different strains // *Infect Immun*. 2003. Vol. 71, N 7. P. 3901–3908. doi: 10.1128/IAI.71.7.3901-3908.2003
25. Furrie E., Macfarlane S., Thomson G., et al. Toll-like receptors-2, -3 and -4 expression patterns on human colon and their regulation by mucosal-associated bacteria // *Immunology*. 2005. Vol. 115, N 4. P. 565–574. doi: 10.1111/j.1365-2567.2005.02200.x
26. Amemiya K., Dankmeyer J.L., Bernhards R.C., et al. Activation of toll-like receptors by live gram-negative bacterial pathogens reveals mitigation of TLR4 responses and activation of TLR5 by flagella // *Front Cell Infect Microbiol*. 2021. Vol. 11. P. 745325. doi: 10.3389/fcimb.2021.745325
27. Hellwing C., Schoeniger A., Roessler C., et al. Lipid raft localization of TLR2 and its co-receptors is independent of membrane lipid composition // *Peer J*. 2018. Vol. 6. P. e4212. doi: 10.7717/peerj.4212
28. Triantafilou M., Miyake K., Golenbock D.T., Triantafilou K. Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation // *J Cell Sci*. 2002. Vol. 115, N Pt 12. P. 2603–2611. doi: 10.1242/jcs.115.12.2603
29. Wong S.W., Kwon M.J., Choi A.M., et al. Fatty acids modulate Toll-like receptor 4 activation through regulation of receptor dimerization and recruitment into lipid rafts in a reactive oxygen species-dependent manner // *J Biol Chem*. 2009. Vol. 284, N 40. P. 27384–27392. doi: 10.1074/jbc.M109.044065
30. Soong G., Reddy B., Sokol S., et al. TLR2 is mobilized into an apical lipid raft receptor complex to signal infection in airway epithelial cells // *J Clin Invest*. 2004. Vol. 113, N 10. P. 1482–1489. doi: 10.1172/JCI20773
31. Salyer A.C., Caruso G., Khetani K.K., et al. Identification of adjuvant activity of amphotericin B in a novel, multiplexed, poly-TLR/NLR high-throughput screen // *PLoS One*. 2016. Vol. 11, N 2. P. e0149848. doi: 10.1371/journal.pone.0149848
32. Razonable R.R., Henault M., Watson H.L., Paya C.V. Nystatin induces secretion of interleukin (IL)-1beta, IL-8, and tumor necrosis factor alpha by a toll-like receptor-dependent mechanism // *Antimicrob Agents Chemother*. 2005. Vol. 49, N 8. P. 3546–3549. doi: 10.1128/AAC.49.8.3546-3549.2005
33. Song J., Bishop B.L., Li G., et al. TLR4-initiated and cAMP-mediated abrogation of bacterial invasion of the bladder // *Cell Host Microbe*. 2007. Vol. 1, N 4. P. 287–298. doi: 10.1016/j.chom.2007.05.007
34. Mittal R., Debs L.H., Patel A.P., et al. Otopathogenic *Staphylococcus aureus* invades human middle ear epithelial cells primarily through cholesterol dependent pathway // *Sci Rep*. 2019. Vol. 9, N 1. P. 10777. doi: 10.1038/s41598-019-47079-7
35. Goluszko P., Nowicki B. Membrane cholesterol: a crucial molecule affecting interactions of microbial pathogens with mammalian cells // *Infect Immun*. 2005. Vol. 73, N 12. P. 7791–7796. doi: 10.1128/IAI.73.12.7791-7796.2005
36. Harush-Frenkel O., Rozentur E., Benita S., Altschuler Y. Surface charge of nanoparticles determines their endocytic and transcytotic pathway in polarized MDCK cells // *Biomacromolecules*. 2008. Vol. 9, N 2. P. 435–443. doi: 10.1021/bm700535p
37. Zemljic Jokhadar S., Božič B., Kristanc L., Gomišček G. Osmotic effects induced by pore-forming agent nystatin: from lipid vesicles to the cell // *PLoS One*. 2016. Vol. 11, N 10. P. e0165098. doi: 10.1371/journal.pone.0165098
38. Zhang X., Li T., Chen X., et al. Nystatin enhances the immune response against *Candida albicans* and protects the ultrastructure of the vaginal epithelium in a rat model of vulvo-vaginal candidiasis // *BMC Microbiol*. 2018. Vol. 18, N 1. P. 166. doi: 10.1186/s12866-018-1316-3
39. Cai C., Zhu H., Chen J. Overexpression of caveolin-1 increases plasma membrane fluidity and reduces P-glycoprotein function in Hs578T/Dox // *Biochem Biophys Res Commun*. 2004. Vol. 320, N 3. P. 868–874. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.06.030
40. Hoffmann C., Berking A., Agerer F., et al. Caveolin limits membrane microdomain mobility and integrin-mediated uptake of fibronectin-binding pathogens // *J Cell Sci*. 2010. Vol. 123, N 24. P. 4280–4291. doi: 10.1242/jcs.064006
41. Bonazzi M., Veiga E., Pizarro-Cerdá J., Cossart P. Successive post-translational modifications of E-cadherin are required for InlA-mediated internalization of *Listeria monocytogenes* // *Cell Microbiol*. 2008. Vol. 10, N 11. P. 2208–2222. doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01200.x
42. Tsaplina O., Bozhokina E. Bacterial outer membrane protein ompX regulates beta1 integrin and epidermal growth factor receptor (EGFR) involved in invasion of M-HeLa cells by *Serratia proteamaculans* // *Int J Mol Sci*. 2021. Vol. 22, N 24. P. 13246. doi: 10.3390/ijms222413246

References

- Buccini DF, Cardoso MH, Franco OL. Antimicrobial peptides and cell-penetrating peptides for treating intracellular bacterial infections. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:612931. doi: 10.3389/fcimb.2020.612931
- Khanna A, Khanna M, Aggarwal A. *Serratia marcescens* – a rare opportunistic nosocomial pathogen and measures to limit its spread in hospitalized patients. *J Clin Diagn Res.* 2013;7(2):243–246. doi: 10.7860/JCDR/2013/5010.2737
- Bozhokina ES, Tsaplina OA, Efremova TN, et al. Bacterial invasion of eukaryotic cells can be mediated by actin-hydrolysing metalloproteases grimeysin and protealysin. *Cell Biol Int.* 2011;35(2):111–118. doi: 10.1042/CBI20100314
- Efremova T, Ender N, Brudnaja M, et al. Specific invasion of transformed cells by *Escherichia coli* A2 strain. *Cell Biol Int.* 2001;25(6):557–561. doi: 10.1006/cbir.2001.0670
- de Laurentiis A, Donovan L, Arcaro AL. Lipid rafts and caveolae in signaling by growth factor receptors. *Open Biochem J.* 2007;1:12–32. doi: 10.2174/1874091X00701010012
- Bagam P, Singh DP, Inda ME, Batra S. Unraveling the role of membrane microdomains during microbial infections. *Cell Biol Toxicol.* 2017;33(5):429–455. doi: 10.1007/s10565-017-9386-9
- Monjarás Fera J, Valvano MA. An overview of anti-eukaryotic T6SS effectors. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:584751. doi: 10.3389/fcimb.2020.584751
- Machado FS, Rodriguez NE, Adesse D, et al. Recent developments in the interactions between caveolin and pathogens. *Adv Exp Med Biol.* 2012;729:65–82. doi: 10.1007/978-1-4614-1222-9_5
- Konkel ME, Samuelson DR, Eucker TP, et al. Invasion of epithelial cells by *Campylobacter jejuni* is independent of caveolae. *Cell Commun Signal.* 2013;11:100. doi: 10.1186/1478-811X-11-100
- Eierhoff T, Bastian B, Thuenauer R, et al. A lipid zipper triggers bacterial invasion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;111(35):12895–12900. doi: 10.1073/pnas.1402637111
- Ishii M, Fukuoka Y, Deguchi S, et al. Energy-dependent endocytosis is involved in the absorption of indomethacin nanoparticles in the small intestine. *Int J Mol Sci.* 2019;20(3):476. doi: 10.3390/ijms20030476
- Kruger K, Schrader K, Klempt M. Cellular response to titanium dioxide nanoparticles in intestinal epithelial Caco-2 cells is dependent on endocytosis-associated structures and mediated by EGFR. *Nanomaterials (Basel).* 2017;7(4):79. doi: 10.3390/nano7040079
- Zhu XD, Zhuang Y, Ben JJ, et al. Caveolae-dependent endocytosis is required for class A macrophage scavenger receptor-mediated apoptosis in macrophages. *J Biol Chem.* 2011;286(10):8231–8239. doi: 10.1074/jbc.M110.145888
- Rosello-Busquets C, Hernaiz-Llorens M, Soriano E, Martínez-Mármol R. Nystatin regulates axonal extension and regeneration by modifying the levels of nitric oxide. *Front Mol Neurosci.* 2020;13:56. doi: 10.3389/fnmol.2020.00056
- Tsai YH, Chen WL. Host lipid rafts as the gates for listeria monocytogenes infection: a mini-review. *Front Immunol.* 2020;11:1666. doi: 10.3389/fimmu.2020.01666
- Zaas DW, Duncan M, Rae Wright J, Abraham SN. The role of lipid rafts in the pathogenesis of bacterial infections. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1746(3):305–313. doi: 10.1016/j.bbamcr.2005.10.003
- Chaudhary N, Gomez GA, Howes MT, et al. Endocytic cross-talk: cavins, caveolins, and caveolae regulate clathrin-independent endocytosis. *PLoS Biol.* 2014;12(4):e1001832. doi: 10.1371/journal.pbio.1001832
- Silva LND, Garcia IJP, Valadares JMM, et al. Evaluation of cardiotoxic steroid modulation of cellular cholesterol and phospholipid. *J Membr Biol.* 2021;254(5–6):499–512. doi: 10.1007/s00232-021-00203-z
- Lim JY, Barnett TC, Bastiani M, et al. Caveolin 1 restricts Group A Streptococcus invasion of nonphagocytic host cells. *Cell Microbiol.* 2017;19(12). doi: 10.1111/cmi.12772
- Fadeyibi O, Rybalchenko N, Mabry S, et al. The Role of lipid rafts and membrane androgen receptors in androgen's neurotoxic effects. *J Endocr Soc.* 2022;6(5):bvac030. doi: 10.1210/jendso/bvac030
- Foster LJ, De Hoog CL, Mann MCL. Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(10):5813–5818. doi: 10.1073/pnas.0631608100
- Lamberti Y, Alvarez Hayes J, Perez Vidakovic ML, Rodriguez ME. Cholesterol-dependent attachment of human respiratory cells by *Bordetella pertussis*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2009;56(2):143–150. doi: 10.1111/j.1574-695X.2009.00557.x
- Berson Y, Khaitlina S, Tsaplina O. Involvement of lipid rafts in the invasion of opportunistic bacteria *Serratia* into eukaryotic cells. *Int J Mol Sci.* 2023;24(10):9029. doi: 10.3390/ijms24109029
- Pridmore AC, Jarvis GA, John CM, et al. Activation of toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4/MD2 by *Neisseria* is independent of capsule and lipooligosaccharide (LOS) sialylation but varies widely among LOS from different strains. *Infect Immun.* 2003;71(7):3901–3908. doi: 10.1128/IAI.71.7.3901-3908.2003
- Furrie E, Macfarlane S, Thomson G, et al. Toll-like receptors-2, -3 and -4 expression patterns on human colon and their regulation by mucosal-associated bacteria. *Immunology.* 2005;115(4):565–574. doi: 10.1111/j.1365-2567.2005.02200.x
- Amemiya K, Dankmeyer JL, Bernhards RC, et al. Activation of toll-like receptors by live gram-negative bacterial pathogens reveals mitigation of TLR4 responses and activation of TLR5 by flagella. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11:745325. doi: 10.3389/fcimb.2021.745325
- Hellwing C, Schoeniger A, Roessler C, et al. Lipid raft localization of TLR2 and its co-receptors is independent of membrane lipid composition. *Peer J.* 2018;6:e4212. doi: 10.7717/peerj.4212
- Triantafilou M, Miyake K, Golenbock DT, Triantafilou K. Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 12):2603–2611. doi: 10.1242/jcs.115.12.2603
- Wong SW, Kwon MJ, Choi AM, et al. Fatty acids modulate Toll-like receptor 4 activation through regulation of receptor dimerization and recruitment into lipid rafts in a reactive oxygen species-dependent manner. *J Biol Chem.* 2009;284(40):27384–27392. doi: 10.1074/jbc.M109.044065
- Soong G, Reddy B, Sokol S, et al. TLR2 is mobilized into an apical lipid raft receptor complex to signal infection in airway epithelial cells. *J Clin Invest.* 2004;113(10):1482–1489. doi: 10.1172/JCI20773
- Salyer AC, Caruso G, Khetani KK, et al. Identification of adjuvant activity of amphotericin B in a novel, multiplexed, poly-TLR/

- NLR high-throughput screen. *PLoS One*. 2016;11(2):e0149848. doi: 10.1371/journal.pone.0149848
32. Razonable RR, Henault M, Watson HL, Paya CV. Nystatin induces secretion of interleukin (IL)-1beta, IL-8, and tumor necrosis factor alpha by a toll-like receptor-dependent mechanism. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(8):3546–3549. doi: 10.1128/AAC.49.8.3546-3549.2005
 33. Song J, Bishop BL, Li G, et al. TLR4-initiated and cAMP-mediated abrogation of bacterial invasion of the bladder. *Cell Host Microbe*. 2007;1(4):287–298. doi: 10.1016/j.chom.2007.05.007
 34. Mittal R, Debs LH, Patel AP, et al. Otopathogenic *Staphylococcus aureus* invades human middle ear epithelial cells primarily through cholesterol dependent pathway. *Sci Rep*. 2019;9(1):10777. doi: 10.1038/s41598-019-47079-7
 35. Goluszko P, Nowicki B. Membrane cholesterol: a crucial molecule affecting interactions of microbial pathogens with mammalian cells. *Infect Immun*. 2005;73(12):7791–7796. doi: 10.1128/IAI.73.12.7791-7796.2005
 36. Harush-Frenkel O, Rozentur E, Benita S, Altschuler Y. Surface charge of nanoparticles determines their endocytic and transcytotic pathway in polarized MDCK cells. *Biomacromolecules*. 2008;9(2):435–443. doi: 10.1021/bm700535p
 37. Zemljic Jokhadar S, Božič B, Kristanc L, Gomišček G. Osmotic effects induced by pore-forming agent nystatin: from lipid vesicles to the cell. *PLoS One*. 2016;11(10):e0165098. doi: 10.1371/journal.pone.0165098
 38. Zhang X, Li T, Chen X, et al. Nystatin enhances the immune response against *Candida albicans* and protects the ultrastructure of the vaginal epithelium in a rat model of vulvovaginal candidiasis. *BMC Microbiol*. 2018;18(1):166. doi: 10.1186/s12866-018-1316-3
 39. Cai C, Zhu H, Chen J. Overexpression of caveolin-1 increases plasma membrane fluidity and reduces P-glycoprotein function in Hs578T/Dox. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;320(3):868–874. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.06.030
 40. Hoffmann C, Berking A, Agerer F, et al. Caveolin limits membrane microdomain mobility and integrin-mediated uptake of fibronectin-binding pathogens. *J Cell Sci*. 2010;123(24):4280–4291. doi: 10.1242/jcs.064006
 41. Bonazzi M, Veiga E, Pizarro-Cerdá J, Cossart P. Successive post-translational modifications of E-cadherin are required for InlA-mediated internalization of *Listeria monocytogenes*. *Cell Microbiol*. 2008;10(11):2208–2222. doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01200.x
 42. Tsaplina O, Bozhokina E. Bacterial outer membrane protein ompx regulates beta1 integrin and epidermal growth factor receptor (EGFR) involved in invasion of M-HeLa cells by *Serratia proteamaculans*. *Int J Mol Sci*. 2021;22(24):13246. doi: 10.3390/ijms222413246

Информация об авторах / Information about the authors

ФГБУН «Институт цитологии Российской академии наук», Санкт-Петербург, Россия
 Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

Юлия Михайловна Берсон — аспирант группы молекулярной цитологии прокариот и бактериальной инвазии.

Адрес: Россия, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4.

ORCID: 0000-0003-0548-3745;

eLibrary SPIN: 5562-1057;

e-mail: juletschka.ber@gmail.com

Yuliya M. Berson — postgraduate student of the group of molecular cytology of prokaryotes and bacterial invasion.

Address: 4 Tikhoretsky Ave., Saint Petersburg, 194064, Russia.

ORCID: 0000-0003-0548-3745;

eLibrary SPIN: 5562-1057;

e-mail: juletschka.ber@gmail.com