

DOI: 10.31116/tsitol.2018.08.06

**ОСОБЕННОСТИ ФАГОЦИТОЗА ОПСОНИЗИРОВАННЫХ И НЕОПСОНИЗИРОВАННЫХ БАКТЕРИЙ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* И *ESCHERICHIA COLI* НЕЙТРОФИЛЬНЫМИ ГРАНУЛОЦИТАМИ ЧЕЛОВЕКА, ИССЛЕДОВАННЫЕ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ**

© С. Н. Плескова,<sup>1,2,\*</sup> Р. Н. Крюков,<sup>1</sup> Е. В. Разумкова,<sup>1,2</sup>  
С. Ю. Зубков,<sup>1</sup> Н. В. Абарбанель<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Научно-образовательный центр «Физика твердотельных наноструктур»  
Нижегородского государственного университета им. Н. И. Лобачевского,  
Нижний Новгород, 603950, и

<sup>2</sup> Кафедра «Нанотехнологии и биотехнологии» Нижегородского государственного  
технического университета им. Р. Е. Алексеева, Нижний Новгород, 603950;  
\* электронный адрес: pleskova@mail.ru

Исследовали различия в процессе фагоцитоза опсонизированных и неопсонизированных штаммов *Staphylococcus aureus* 2879 М и *Escherichia coli* 321. Выявлены различия в характере псевдоподий при фагоцитозе нейтрофильными гранулоцитами (НГ) опсонизированных и неопсонизированных бактерий, при этом различий в характере псевдоподий в реакциях на грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы не обнаружено. Впервые в динамических наблюдениях на поздних стадиях фагоцитоза показаны изменение объема ядер, их движение, колебания межсегментарного расстояния ядер и незначительное увеличение объема НГ. Впервые обнаружено снижение ригидности мембрано-цитоскелетного комплекса НГ, коррелирующее с интенсивностью фагоцитоза и опсонизацией бактерий. Установлено, что опсонизация не оказывает влияния на кислородзависимый метаболизм НГ и в то же время вносит существенные коррективы в реализацию кислороднезависимых механизмов бактерицидности клеток.

Ключевые слова: нейтрофильные гранулоциты, фагоцитоз, опсонизация, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, псевдоподии, атомно-силовая микроскопия, ригидность мембрано-цитоскелетного комплекса

Принятые сокращения: АСМ — атомно-силовая микроскопия, АФК — активные формы кислорода, КФ — кислая фосфатаза, ЛКБ — лизосомально-катионные белки, ЛКТ — лизосомально-катионный тест, МПО — миелопероксидаза, НГ — нейтрофильные гранулоциты, НСТ — нитросиний тетразолий, СЦК — средний цитохимический коэффициент, ЩФ — щелочная фосфатаза, РАМР — патогеноассоциированный молекулярный образ (pathogen-associated molecular patterns), PBS — фосфатно-солевой буферный раствор, PGRP — белок, распознающий пептидогликан (peptidoglycan recognition protein).

Нейтрофильные гранулоциты (НГ) являются одним из основных звеньев системы неспецифической резистентности, для которого в последнее время доказано участие в развитии и регуляции адаптивного иммунитета (Yang et al., 2010). Несмотря на реализацию большого количества функций (регуляторную, супрессорную, про- и противовоспалительную, про- и противоопухолевую) (Нестерова и др., 2017), наиболее ярко активность НГ проявляется участием в экссудативно-деструктивном воспалении (Маянский, 2006). С точки зрения развития воспалительной реакции НГ является одновременно и индукторной (трансэндотелиальная миграция, синтез цитокинов и изменение рецепторного спектра), и эффекторной клеткой (фагоцитарный киллинг микроорганизмов, комплекс ре-

акций респираторного взрыва, секреторная дегрануляция и нетоз).

В процессе фагоцитоза НГ элиминируют чужеродный агент, вызвавший его активацию (Brown et al., 2015). Различают два варианта фагоцитоза. В ходе «неиммунного» фагоцитоза (в отсутствие опсоинов) распознавание осуществляется с участием со стороны НГ образораспознающих рецепторов (PRR, pattern recognition receptors), в частности Toll- и Toll-подобных рецепторов передачи сигналов (Arancibia et al., 2007), а также рецепторов маннозы и эндоцитоза (Seimon et al., 2006). Эти рецепторы распознают патогеноассоциированный молекулярный образ (РАМР) бактерий. Такая система относится к эволюционно более древним и реализуется, как правило, при

первичной встрече фагоцита и патогена (Møller et al., 2005).

В процессе «иммунного» фагоцитоза (при участии опсоинов) «посредническую» функцию между фагоцитом и объектом фагоцитоза осуществляют опсоины: иммуноглобулины (Ig G1, Ig G3 и Ig A), компоненты компонента (C3b, iC3b, C4b и C1q), белки острой фазы, липополисахаридсвязывающий белок, маннозосвязывающий лектин и фибронектин (Белоцкий, Авталион, 2008). В самых благоприятных условиях поглощение опсонизированных объектов может происходить за 10—30 с (Ryter, Chastellier, 1983).

В настоящее время в связи с появлением новых высоко разрешающих методов микроскопии, в частности атомно-силовой микроскопии (АСМ), реализацию фагоцитоза можно наблюдать в динамике на живых клетках с недоступным ранее разрешением. Целью настоящей работы стало исследование процесса фагоцитоза опсонизированных и неопсонизированных штаммов *Staphylococcus aureus* 2879 М и *Escherichia coli* 321 НГ методом АСМ. Подобран способ фиксации препаратов, оптимальный для исследования морфологических параметров и подсчета фагоцитарного числа НГ. Мы выявили особенности формирования псевдоподий и ламеллоподий НГ при фагоцитозе *S. aureus* и *E. coli* и оценили динамику фагоцитоза в зависимости от опсонизации методом АСМ. Описаны изменения основных морфологических параметров НГ в процессе фагоцитоза в витальном образце. Кроме того, определяли изменение ригидности мембрано-цитоскелетного комплекса НГ в зависимости от объекта фагоцитоза и сравнивали морфологические изменения НГ при фагоцитозе опсонизированных и неопсонизированных бактерий с изменением основных цитохимических показателей.

### Материал и методика

**Выделение клеток.** Исследовали венозную кровь здоровых доноров обоего пола в возрасте 20—40 лет. Забор крови производили в утреннее время, после подписания донорами бланка информированного согласия. Гепаринизированную кровь фракционировали на двойном градиенте фиколла-урографина ( $\rho = 1.077$  и  $1.116$  г/мл, 200 г, 40 мин). Полученную фракцию НГ дважды отмывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS), содержащим  $0.137$  М NaCl и  $0.0027$  М KCl, pH 7.35 (200 г, 3 мин) и использовали в конечной концентрации  $1 \cdot 10^6$  кл. на 1 мл среды. Клетки брали в эксперимент сразу после выделения, жизнеспособность по тесту с трипановым синим составляла не менее 99 % (Подосиных и др., 1981). Для предотвращения активации клеток поверхностью стекла использовали силиконированные пробирки. Во всех экспериментах средой инкубации являлся PBS.

**Бактериальные суспензии.** В работе использовали музейные штаммы *S. aureus* 2879 М и *E. coli* 321 кафедры «Нанотехнологии и биотехнологии» Нижегородского государственного технического университета им. Р. Е. Алексеева. Культуры выращивали 24 ч при  $37^\circ\text{C}$  на ГМР-агаре (ГНЦ ПМБ, Оболенск), бактерии смывали стерильным PBS, трижды отмывали центрифугированием (2350 г, 10 мин), ресуспендировали в PBS и доводили оптическую плотность на фотоколориметре (КФК-2МП-УХЛ, Россия) до 0.75 отн. ед. для *S. aureus*

2879 М и 0.85 отн. ед. для *E. coli* 321 ( $\lambda = 670$  нм), что соответствует  $1 \cdot 10^9$  кл./мл (начальная концентрация клеток).

Для серии экспериментов с опсонизированными бактериями использовали пул сывороток 3 здоровых доноров и более. Сыворотки инкубировали с суспензией бактерий в соотношении 3 : 1 по объему ( $37^\circ\text{C}$ , 60 мин), после чего трижды отмывали PBS и использовали опсонизированные бактерии в начальной концентрации  $1 \cdot 10^9$  кл./мл. Необходимость использования пула сывороток от нескольких доноров обусловлена индивидуальной вариабельностью содержания опсоинов.

АСМ в исследовании фиксированных препаратов. Для подсчета фагоцитарного индекса бактерий *S. aureus* 2879 М или *E. coli* 321 в концентрации  $500 \cdot 10^6$  кл./мл инкубировали с НГ ( $1 \cdot 10^6$  кл./мл) в соотношении 1 : 1 по объему либо в течение 5, 10, 15 и 20 мин ( $37^\circ\text{C}$ ) для неопсонизированных бактерий, либо в течение 3, 5, 10 и 15 мин ( $37^\circ\text{C}$ ) для опсонизированных бактерий, после чего переносили на поверхность стекла. Фиксировали либо глутаровым альдегидом (2.5 %, 20 мин,  $24^\circ\text{C}$ ) (Panreac, Европейский союз), либо метанолом (99.8 %, 0.05 мл, 5 мин,  $24^\circ\text{C}$ ) (Acros Organic, США), трижды отмывали мазки дистиллированной водой и сканировали на воздухе с помощью прибора NTegra Spectra (NT-MDT, Россия), зондами DNP — А, В, С и D (Bruker, США) с радиусом закругления 20 нм, углом при вершине  $15^\circ$ , резонансной частотой 18—65 кГц (Плескова и др., 2005).

АСМ в исследовании динамики фагоцитоза в режиме реального времени. АСМ-исследования нативных НГ проводили, как описано ранее (Плескова, 2011), в витальном состоянии в полуконтактном режиме. Суспензию НГ в PBS ( $1 \cdot 10^6$  кл./мл) вносили в пластиковую чашку Петри (35 мм, Corning, США) и после спонтанной адгезии НГ (20 мин,  $37^\circ\text{C}$ ) не менее трех раз сканировали клетки (контрольный эксперимент). Для сканирования использовали прибор NTegra Spectra (NT-MDT, Россия), зонды DNP — А, В, С и D (Bruker, США) с радиусом закругления 20 нм, углом при вершине  $15^\circ$ , резонансной частотой 18—65 кГц. После получения контрольных сканов к НГ вносили бактерии (опсонизированные или неопсонизированные) в концентрации  $500 \cdot 10^6$  кл./мл и исследовали динамику процесса фагоцитоза в режиме реального времени.

FS-спектроскопия в определении ригидности мембрано-цитоскелетного комплекса НГ. Для оценки ригидности мембрано-цитоскелетного комплекса использовали метод силовых кривых, в котором применяется режим спектроскопии АСМ. Расчет ригидности мембран проводили с использованием модели Герца (Bukharaev et al., 2003). Исследования ригидности проводили в PBS с использованием зондов MLCT-C и D с радиусом закругления 20 нм, углом при вершине  $35^\circ$ , константой жесткости 0.01 и 0.03 Н/м, номинальной резонансной частотой 7 и 15 кГц (Bruker, США). В серии экспериментов изучали клетки, полученные из крови здоровых доноров, и сравнивали показатели упругости мембраны НГ до и после добавления бактерий. Для обработки и визуализации сканируемых объектов использовали программу Nova NT-MDT SPM Software (NT-MDT, Россия). При дальнейшей обработке данных использовали программное обеспечение SPMLab Analysis Only (Topometrix, США) и Gwyddion (факультет нанометрологии Чешского метрологического института, Чехия).

Цитохимические методы в оценке биохимического статуса НГ в процессе фагоцитоза. Для оценки эффективности кислороднезависимых защитных реакций НГ проводили лизосомально-катионный тест (ЛКТ) (Пигаревский, 1988). Высушенные мазки фиксировали в спиртовом растворе формалина 10—15 с. Для избирательной окраски катионного белка гранулоцитов использовали забуференный спиртовой раствор прочного зеленого (Sigma, США). Ядра нейтрофилов окрашивали раствором азура А (Sigma, США). Микроскопирование проводили на световом оптическом микроскопе Olympus IX71 с использованием иммерсионного объектива 100× (Olympus, Япония). При микроскопировании просматривали 100 гранулоцитов. Внутриклеточное содержание катионных белков гранулоцитов оценивали по величине среднего цитохимического коэффициента (СЦК), вычисляемого по формуле

$$\text{СЦК} = (3a + 2b + 1v + 0g)/100,$$

где  $a$ — $g$  — количество клеток с определенной степенью окраски гранул, а цифры являются показателями степени выраженности окраски. Помимо определения СЦК проводили дифференциальную оценку цитоспиновых препаратов, учитывая из 100 клеток процентное соотношение малоактивных, среднеактивных и высокоактивных клеток.

Кислородзависимый метаболизм НГ оценивали по методу Маянского (Маянский, Пикуза, 1993), в основе которого лежит реакция восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) (ThermoFisher Scientific, США): при формировании активных форм кислорода (АФК) в цитоплазме накапливаются гранулы нерастворимого диформазана. Оценивали количество НСТ-позитивных клеток до инкубации с бактериями (контроль) и после инкубации в течение 30 мин (опыт). НСТ-тест проводили в двух вариантах: монодействие на НГ — определяли число диформазановых гранул в цитоплазме клеток в отсутствие стимуляции либо сочетанное воздействие — после реализации респираторного взрыва, вызванного опсонизированным зимозаном.

Исследования активности щелочной фосфатазы проводили по методу азосочетания (Шубич, Нагоев, 1980), а кислой фосфатазы — по методу Берстона (Burstone, 1958), используя готовые наборы (ООО Гемстандарт, Россия) для окрашивания мазков, фиксированных в смеси этилового спирта и формалина (40%), взятых в соотношении 1 : 9 по объему, в течение 30—40 с при комнатной температуре (ООО Эль Групп, Россия). При микроскопировании просматривали 100 гранулоцитов. Внутриклеточное содержание гидролитических ферментов гранулоцитов оценивали по величине СЦК.

Оценку общего содержания фосфолипидов НГ проводили по методу Акермана в фиксированных 40%-ным формалином (10 мин, 37 °С) мазках, окрашенных суданом черным В (60 мин, 37 °С) (Askerman, 1952). Процентное содержание липидсодержащих гранулоцитов определяли микроскопически с последующим расчетом СЦК.

Запас гликогена НГ оценивали по методу Хейхоу и Кваглино (1983), в основе которого лежит ШИК-реакция. Для окрашивания мазков, фиксированных в 10%-ной спирт-формалиновой смеси в течение 10 мин при комнатной температуре, использовали готовые наборы (НПФ Абрис+, Россия). Внутриклеточное содержание гликоге-

на исследовали при микроскопировании 100 НГ, а количественную оценку углеводных запасов проводили подсчетом СЦК.

Статистический анализ. Определяли границы нормального распределения количественных показателей выборок с использованием критерия Шапиро—Уилка. Поскольку все распределения не были нормальными, использовали двухвыборочный критерий Вилкоксона (непараметрическая статистика). Различия между двумя выборками считали значимыми при  $P < 0.05$ . Для статистического анализа использовали программу Origin Pro 8 (Origin Lab Corporation, США).

## Результаты и обсуждение

Для исследования морфологии НГ использовали два метода фиксации: 99.8%-ным метанолом в течение 5 мин с последующей «жесткой» отмывкой дистиллированной водой либо 2.5%-ным глутаровым альдегидом в течение 20 мин с «мягкой» поэтапной отмывкой в дистиллированной воде методом полного погружения препаратов в чашки Петри.

Подсчет фагоцитарного индекса практически невозможен при использовании в качестве фиксирующего агента глутарового альдегида (рис. 1, *a*), поскольку при данном методе фиксации цитоплазматическое содержимое оказывается сконцентрированным вокруг ядра и (за редким исключением — рис. 2, *в*) определить внутриклеточную локализацию бактерий нельзя. Поскольку глутаровый альдегид как фиксирующий агент действует достаточно медленно, оценить морфологию псевдоподий сложнее, чем при фиксации метанолом (рис. 1, *a*, *b*). При фиксации метанолом клетка практически мгновенно лишается воды, поэтому структуры, образующиеся в момент воздействия фиксирующего агента, остаются связанными с подложкой и хорошо визуализируются.

НГ полностью распластаны по поверхности подложки, отчего топография внутренней структуры становится отчетливо выраженной. Это позволяет не только определить наличие бактерий внутри НГ, но в некоторых случаях даже подсчитать фагоцитарный индекс. Основные морфологические параметры НГ (диаметр и высота клеток) значительно меняются при использовании разных вариантов фиксации (Плескова и др., 2005), но поскольку с метанолом удастся хорошо визуализировать особенности псевдоподий и подсчитать фагоцитарный индекс, при необходимости работы с фиксированными препаратами предпочтение следует отдать ему.

Тонкие плоские выступы, образованные сильно адгезированными лейкоцитами, называют ламеллоподиями. Движение ламеллоподий передней кромки клетки обусловлено ростом разветвленных актиновых сетей, перекрестно связывающихся через комплекс Arp2/3 (Fritz-Laylin et al., 2017). Более широко распространенная форма движения клеток требует лишь слабого неспецифического взаимодействия с внеклеточной средой, и скорость движения, таким образом, на несколько порядков превышает движение на основе адгезии (Loomis et al., 2012). Этот способ клеточной миграции связан с образованием сложных трехмерных псевдоподий, которые сформированы разветвленными сетями актиновых филаментов. По всей вероятности, комплексные псевдоподии важны не столько для направленного хемотаксиса, сколько для исследования окружающей среды (Leithner et al., 2016; Var-

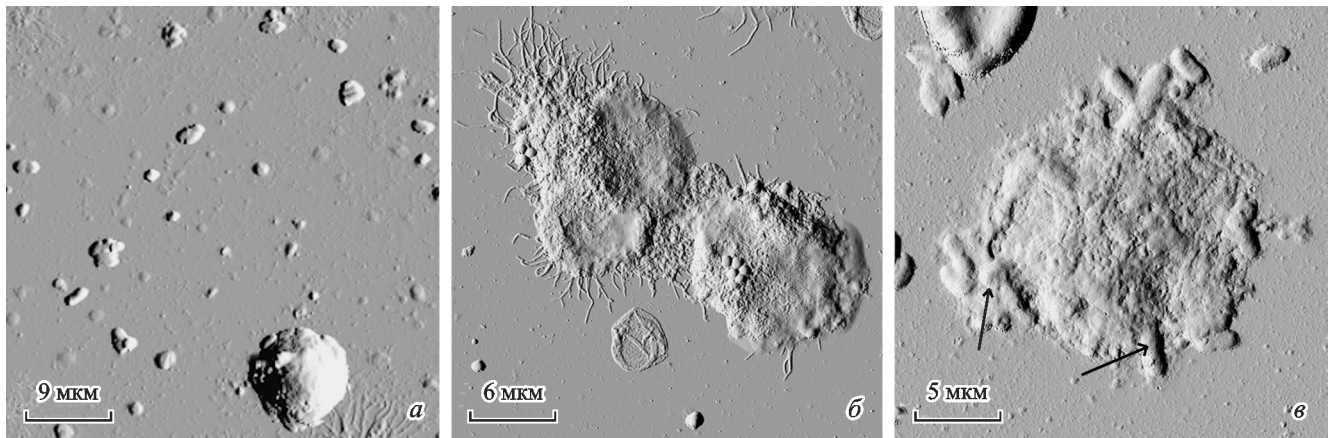


Рис. 1. АСМ-изображения фиксированных нейтрофильных гранулоцитов после инкубации с *Escherichia coli* 321 и фиксации 2.5%-ным глутаровым альдегидом (а, в), после инкубации со *Staphylococcus aureus* 2879 М и фиксации метанолом (б). в — стрелками отмечены бактерии *E. coli* 321, поглощенные нейтрофильным гранулоцитом, которые видны после фиксации 2.5%-ным глутаровым альдегидом (исключительный случай).

gas et al., 2016). В частности, они отвечают за процесс фагоцитоза. В экспериментах по исследованию фагоцитоза на фиксированных образцах очевидно, что и псевдоподии, и ламеллоподии способны принимать самое активное участие в процессе фагоцитоза (рис. 2). Формирующиеся псевдоподии и ламеллоподии достаточно уни-

версальны и не различаются по морфологическим признакам при фагоцитозе *S. aureus* 2879 М и *E. coli* 321 (рис. 2, б, в). Вместе с тем опсонизация может существенным образом оказать влияние на характер формируемых псевдоподий. В частности, через 5 мин взаимодействия с опсонизированным *S. aureus* 2879 М НГ образует

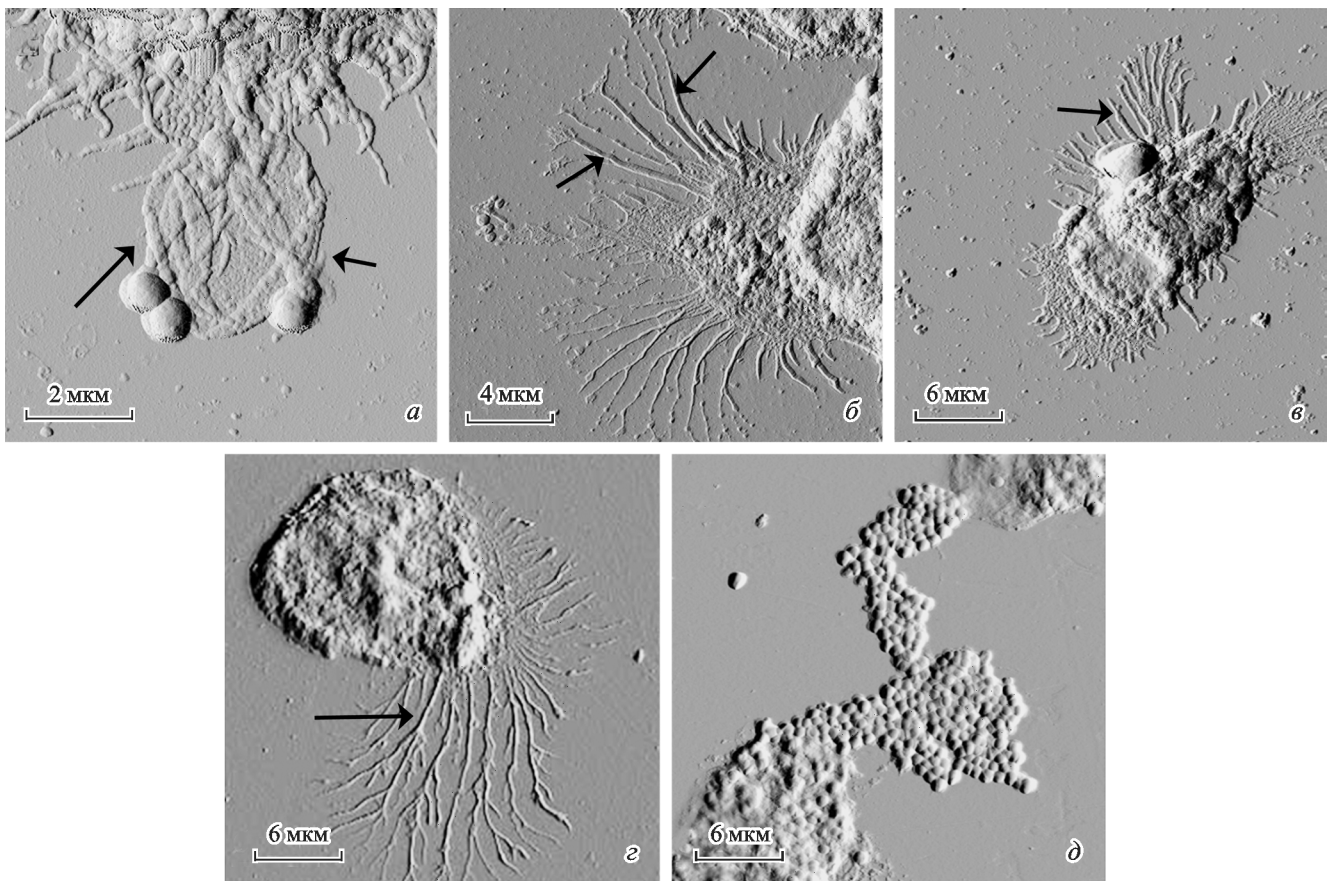


Рис. 2. Образование внеклеточных структур при фагоцитозе бактерий.

Стрелками отмечены ламеллоподии (а) и псевдоподии (б) при фагоцитозе неопсонизированных *Staphylococcus aureus* 2879 М, псевдоподии при фагоцитозе неопсонизированных *Escherichia coli* 321 (в) и хорошо развитые псевдоподии через 5 мин после добавления опсонизированного *S. aureus* 2879 М (г). д — экранирование псевдоподий опсонизированным *S. aureus* 2879 М через 10 мин коинкубации с нейтрофильными гранулоцитами.

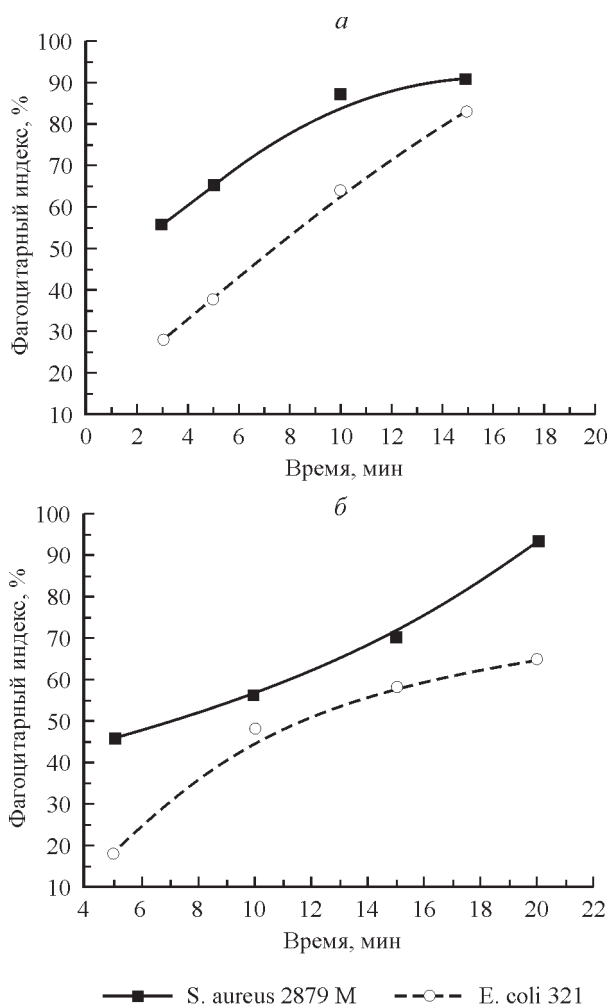


Рис. 3. Изменение фагоцитарного индекса опсонизированных (а) и неопсонизированных (б) *Staphylococcus aureus* 2879 М и *Escherichia coli* 321 в процессе инкубации.

длинные, выраженные, хорошо разветвленные псевдоподии (рис. 2, з), а уже через 10 мин псевдоподии не определяются из-за активно связавшегося с ними стафилококка (рис. 2, д).

После фиксации метанолом мазки исследовали методом АСМ, определяя из 100 клеток число НГ, фагоцитировавших одну бактерию и более (фагоцитарный индекс). Для исследования динамики фагоцитоза мазки фиксировали через 3, 5, 10 и 15 мин после добавления опсонизированных *S. aureus* 2879 М или *E. coli* 321 и через 5, 10, 15 и 20 мин после добавления неопсонизированных штаммов (рис. 3).

И для опсонизированных, и для неопсонизированных бактерий наблюдали сходную тенденцию: *S. aureus* 2879 М более активно поглощается НГ, чем *E. coli* 321. Более активное поглощение неопсонизированного стафилококка может быть объяснено различиями в РАМР у грамположительных и грамотрицательных бактерий. Выявлено, например, что белок, распознающий пептидогликан (PGRP), с гораздо большей аффинностью связывается с пептидогликаном, чем с липополисахаридом (Yang et al., 2017). Помимо разной специфики и аффинности связывания нельзя полностью исключить возможную экранирующую функцию таких клеточных структур, как, например, перитрихии и фимбрии, у *E. coli*.

В случае с опсонизированным *S. aureus* 2879 М все основные группы опсоинов (IgG, С3b и iC3b) связываются на поверхности стафилококка, обуславливая исключительно опсоническую функцию и поглощение бактерий НГ в процессе фагоцитоза. Что касается грамотрицательных бактерий, IgG могут запускать классический каскад активации комплемента, а iC3b — альтернативный каскад комплемента. Система комплемента, в свою очередь, в зависимости от особенностей липополисахарида клеточной стенки грамотрицательных бактерий может реализовывать и не внутрифагоцитарную систему киллинга бактерий, а уничтожение *E. coli* 321 за счет формирования мембранно-атакующего комплекса (Pleskova et al., 2004).

Вместе с тем общее изменение динамики фагоцитоза опсонизированных бактерий было одинаковым, и поглощение наступало быстрее (для опсонизированного *S. aureus* 2879 М 50%-ный фагоцитоз наступал уже через 2 мин, для опсонизированной *E. coli* 321 — через 7 мин). Для неопсонизированных бактерий это время составило 7 и 11 мин соответственно. При этом фагоцитарный индекс (количество НГ, фагоцитировавших бактерии) был выше для опсонизированных штаммов. В частности, через 15 мин совместной инкубации с опсонизированным *S. aureus* 2879 М фагоцитарный индекс составил 90 %, тогда как для неопсонизированного штамма за это же время — только 70 %.

Аналогичную тенденцию наблюдали и для *E. coli* 321: через 15 мин совместной инкубации с опсонизированным штаммом *E. coli* 321 число фагоцитировавших НГ составило 80 %, а с неопсонизированным — 60 %. Такие существенные различия обусловлены одинаковыми условиями проведения экспериментов по изучению фагоцитоза. Вместе с тем недавно выявлен факт, что фагоцитоз суспендированными НГ бактерий зависит от опсонизации, тогда как адгезированные фагоциты поглощают преимущественно неопсонизированные микроорганизмы (Lu et al., 2014; Van Kessel et al., 2014).

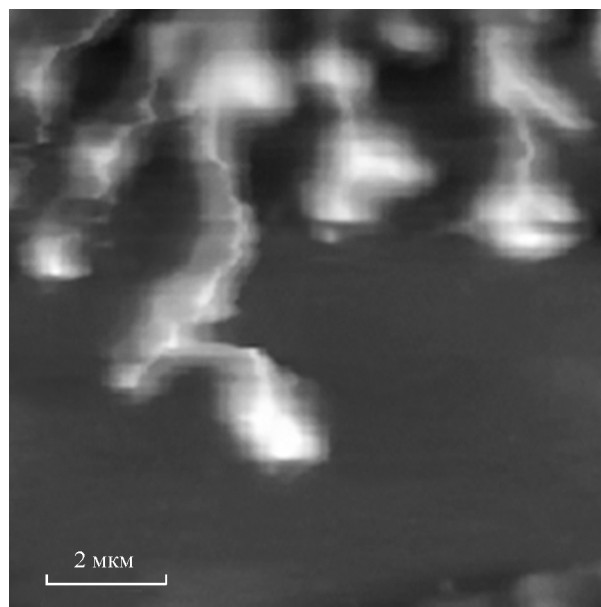


Рис. 4. Образование хорошо развитых псевдоподий живым нейтрофильным гранулоцитом, находящимся в PBS, через 10 мин после добавления опсонизированных *Staphylococcus aureus* 2879 М.

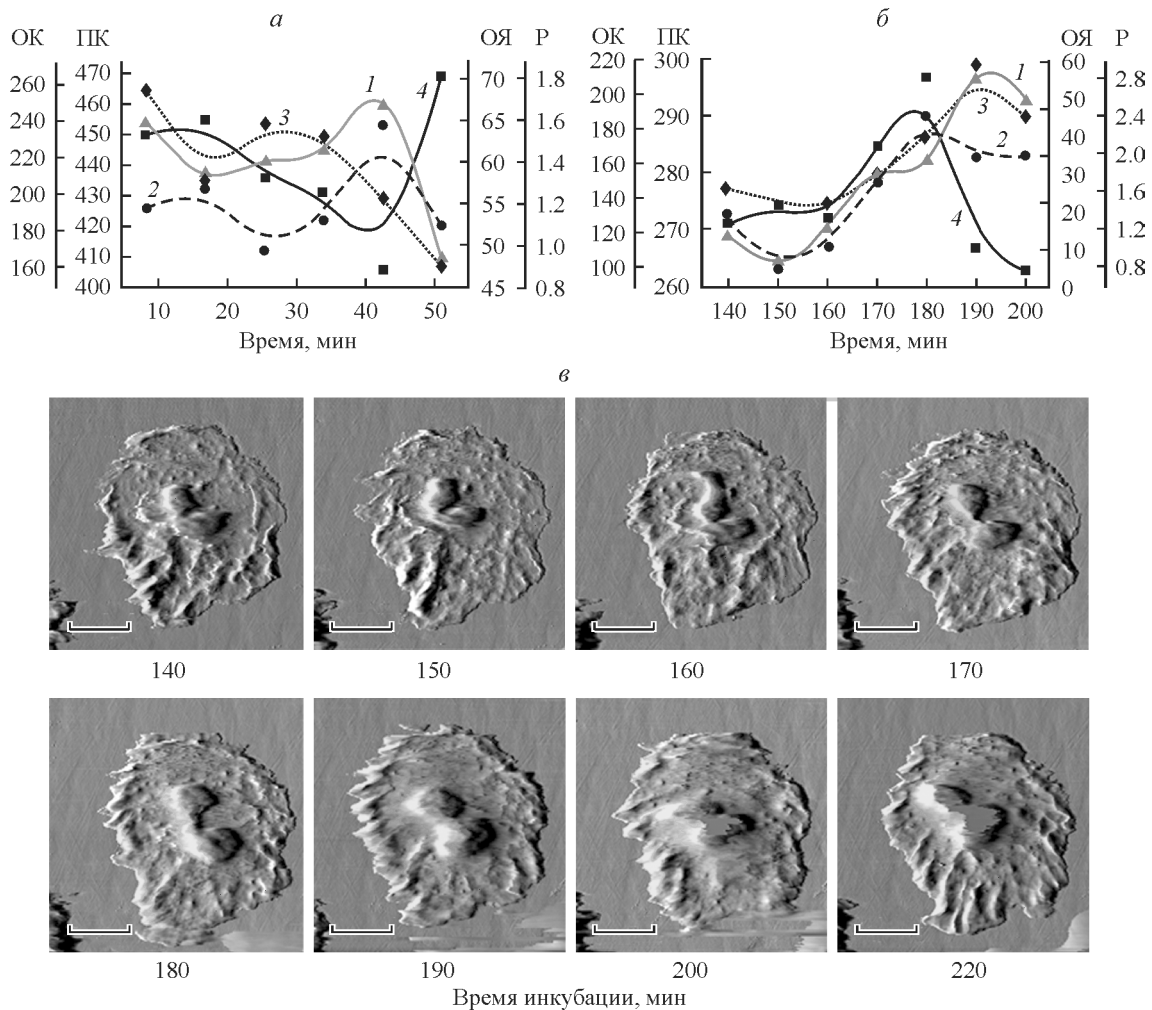


Рис. 5. Изменения основных морфометрических параметров нейтрофильных гранулоцитов в процессе фагоцитоза неопсонизированных штаммов *Staphylococcus aureus* 2879 М (а) и *Escherichia coli* 321 (б) и АСМ-изображения живого нейтрофильного гранулоцита в динамике после инкубации с опсонизированным *S. aureus* 2879 М (в).

По оси ординат: ОК — объем клетки,  $\text{мкм}^3$  (кривая 1), ПК — площадь клетки,  $\text{мкм}^2$  (кривая 2), ОЯ — объем ядра,  $\text{мкм}^3$  (кривая 3), Р — расстояние,  $\text{мкм}$  (кривая 4). Масштабные отрезки — 6  $\text{мкм}$ .

Результаты морфологических изменений НГ в динамике после реализации процесса фагоцитоза опсонизированного *S. aureus* 2879 М представлены на рис. 4 и 5. Хорошо видно, что через 10 мин после внесения опсонизированного *S. aureus* 2879 М НГ образует выраженные псевдоподии при исследовании витальных НГ (рис. 4). Определение основных морфологических параметров НГ проводили с 10-минутным интервалом спустя 140 мин после внесения микроорганизмов к клеткам (рис. 5).

Очевидно, что уже по окончании процесса фагоцитоза в НГ продолжается активное движение, по всей вероятности связанное с процессами внутриклеточного микробного киллинга. Удалось выявить некоторые структурно-морфологические перестройки клетки: постоянное движение элементов цитоскелета, которое не связано с перемещением клеток, а только с движением гранулярно-цитоплазматического содержимого (рис. 5, в); постоянно изменяющееся расстояние между сегментами ядра, колебания объема ядер (рис. 5, а, б), соответственно при увеличении объема сегментов ядер межсегментарное расстояние уменьшается; постоянные колебания объема клетки.

Исследования динамики фагоцитоза с высоким разрешением в режиме реального времени были проведены впервые. Установлено, что в процессе киллинга фагоцитированных бактерий задействованы не только элементы цитоскелета клетки, но и ядро, судя по структурно-морфологическим изменениям НГ. Кроме того, нужно отметить, что в процессе фагоцитоза происходит увеличение объема ядра (в среднем на 31 %), тогда как площадь поверхностной адгезии не изменяется.

Для НГ, которые в процессе диапедеза испытывают силу сопротивления со стороны эндотелиоцитов 100 пН (Edmondson et al., 2005), важным является вопрос о ригидности мембрано-цитоскелетного комплекса. Метод АСМ позволяет не только проводить динамические наблюдения в физиологической среде, но и снимать вязкоупругие характеристики клеточных мембран. Используя метод FS-спектроскопии и модель Герца, мы определили модуль Юнга. Результаты его изменения при фагоцитозе опсонизированных и неопсонизированных *S. aureus* 2879 М и *E. coli* 321 приведены в табл. 1.

Видно, что в процессе фагоцитоза происходит значительное снижение ригидности мембрано-цитоскелетно-

Таблица 1

## Изменение ригидности мембранно-цитоскелетного комплекса НГ (модуль Юнга) в процессе фагоцитоза опсонизированных и неопсонизированных бактерий

| Контрольная группа без фагоцитоза | Модуль Юнга, кПа             |                           |                              |                           |
|-----------------------------------|------------------------------|---------------------------|------------------------------|---------------------------|
|                                   | Фагоцитоз                    |                           |                              |                           |
|                                   | <i>S. aureus</i> 2879 М      |                           | <i>E. coli</i> 321           |                           |
|                                   | ОПС <sup>+</sup>             | ОПС <sup>-</sup>          | ОПС <sup>+</sup>             | ОПС <sup>-</sup>          |
| 28.63 ± 3.33                      | 13.67 ± 3.27 <sup>а, б</sup> | 24.16 ± 7.37 <sup>б</sup> | 16.55 ± 7.77 <sup>а, б</sup> | 29.54 ± 3.21 <sup>б</sup> |

Примечание. <sup>а</sup> Различия с контролем; <sup>б</sup> различия между группами фагоцитоза опсонизированных и неопсонизированных бактерий по данным 12 экспериментов,  $P < 0.05$ . ОПС<sup>+</sup> и ОПС<sup>-</sup> — опсонизированные и неопсонизированные штаммы соответственно.

Таблица 2

## Изменение биохимического профиля НГ в результате фагоцитоза опсонизированных/неопсонизированных бактерий

| Ферменты/запасные вещества | Контроль             | Неопсонизированные бактерии       |                                   | Опсонизированные бактерии            |                                      |
|----------------------------|----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
|                            |                      | <i>S. Aureus</i> 2879 М           | <i>E. Coli</i> 321                | <i>S. Aureus</i> 2879 М              | <i>E. Coli</i> 321                   |
| НАДФН <sup>мв</sup>        | 25.3 ± 1.5 (n = 9)   | 61.20 ± 5.31 <sup>а</sup> (n = 9) | 62.78 ± 5.17 <sup>а</sup> (n = 9) | 61.80 ± 3.76 <sup>а</sup> (n = 12)   | 64.00 ± 3.25 <sup>а</sup> (n = 12)   |
| НАДФН <sup>св</sup>        | 41.2 ± 2.7 (n = 9)   | 66.10 ± 5.21 <sup>а</sup> (n = 9) | 68.70 ± 4.36 <sup>а</sup> (n = 9) | 68.70 ± 3.4 <sup>а</sup> (n = 12)    | 69.80 ± 3.01 <sup>а</sup> (n = 12)   |
| МПО                        | 1.05 ± 0.05 (n = 10) | 1.30 ± 0.11 <sup>а</sup> (n = 10) | 1.29 ± 0.18 <sup>а</sup> (n = 10) | 1.44 ± 0.18 <sup>а</sup> (n = 10)    | 1.34 ± 0.11 <sup>а</sup> (n = 10)    |
| КФ                         | 1.61 ± 0.05 (n = 12) | 1.63 ± 0.16 (n = 12)              | 1.63 ± 0.18 (n = 12)              | 1.79 ± 0.11 <sup>а, б</sup> (n = 12) | 1.76 ± 0.09 <sup>а, б</sup> (n = 12) |
| ЩФ                         | 0.75 ± 0.07 (n = 12) | 0.55 ± 0.16 <sup>а</sup> (n = 12) | 0.54 ± 0.08 <sup>а</sup> (n = 12) | 1.32 ± 0.27 <sup>а, б</sup> (n = 12) | 1.41 ± 0.26 <sup>а, б</sup> (n = 12) |
| КБ                         | 1.54 ± 0.10 (n = 12) | 1.10 ± 0.18 <sup>а</sup> (n = 12) | 1.04 ± 0.17 <sup>а</sup> (n = 12) | 1.31 ± 0.17 <sup>а, б</sup> (n = 12) | 1.34 ± 0.15 <sup>а, б</sup> (n = 12) |
| Гликоген                   | 1.77 ± 0.18 (n = 12) | 1.76 ± 0.45 (n = 12)              | 1.57 ± 0.37 (n = 12)              | 2.13 ± 0.38 <sup>а</sup> (n = 12)    | 2.31 ± 0.35 <sup>а, б</sup> (n = 12) |
| ФЛ                         | 2.72 ± 0.05 (n = 12) | 2.68 ± 0.19 (n = 12)              | 2.70 ± 0.21 (n = 12)              | 2.69 ± 0.22 (n = 12)                 | 2.79 ± 0.18 (n = 12)                 |

Примечание. <sup>а</sup> Различия с контролем,  $P < 0.05$ ; <sup>б</sup> различия между группами фагоцитоза опсонизированных и неопсонизированных бактерий,  $P < 0.05$ . НАДФН<sup>мв</sup> — НАДФН-оксидаза при моновоздействии, НАДФН<sup>св</sup> — НАДФН-оксидаза при сочетанном воздействии, МПО — миелопероксидаза, КФ — кислая фосфатаза, ЩФ — щелочная фосфатаза, КБ — катионные белки, ФЛ — фосфолипиды, n — число экспериментов.

го комплекса НГ, причем чем интенсивнее идет процесс фагоцитоза (в случае с опсонизированными бактериями), тем мембрана менее ригидна.

Исследование основных биохимических параметров НГ в процессе фагоцитоза опсонизированных и неопсонизированных штаммов (табл. 2) показало, что кислород-зависимый метаболизм НГ не изменяется в зависимости от наличия или отсутствия опсоинов на поверхности бактериальных клеток, поскольку и НАДФН-оксидаза, и миелопероксидаза (МПО) изменяются статистически значимо по сравнению с контролем (нефагоцитировавшие НГ), тогда как различий между группами опсонизированных и неопсонизированных бактерий не выявлено. Интересно, что эти результаты соответствуют исследованиям Вандербрук-Граулса с соавторами, которые впервые показали, что выброс лизосомальных ферментов, уровень МПО и образование супероксидного аниона одинаковы во время фагоцитоза опсонизированных или неопсонизированных стафилококков (Vandenbroucke-Graults et al., 1987).

В то же время процесс опсонизации оказывает существенное влияние на кислороднезависимый метаболизм НГ. В частности, мы выявили активацию кислой фосфа-

тазы (КФ) при фагоцитозе опсонизированных бактерий, тогда как в реакциях с неопсонизированными бактериями различий с контролем не обнаружено. Еще более выраженные изменения обнаружены для щелочной фосфатазы (ЩФ), поскольку активность фермента подавляется при фагоцитозе неопсонизированных бактерий и по сравнению с опсонизированными штаммами, и по сравнению с контролем. В то же время активность ЩФ статистически значимо возростала при фагоцитозе опсонизированных микроорганизмов.

Соотношение бактериальных клеток к НГ, используемое в наших экспериментах (500 : 1), вызывало подавление синтеза лизосомально-катионных белков в процессе фагоцитоза всех исследуемых вариантов бактерий, однако опсонизация *S. aureus* 2879 М и *E. coli* 321 уменьшает расход неферментных белков (табл. 2).

Процесс фагоцитоза не влияет на уровень фосфолипидов клетки, в то же время уровень гликогена значительно увеличивается при фагоцитозе опсонизированных бактерий.

Таким образом, сравнение фагоцитоза опсонизированных и неопсонизированных бактерий выявило разницу в морфологии псевдоподий, динамике процесса фаго-

цитоза, ригидности мембрано-цитоскелетного комплекса и реализации кислороднезависимого метаболизма НГ. *S. aureus* поглощается НГ более активно, чем *E. coli*, однако это никак не отражается на биохимическом профиле НГ, но отражается на ригидности мембранно-цитоскелетного комплекса клетки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 16-14-10179).

### Список литературы

- Белоцкий С. М., Авталион Р. Р. 2008. Воспаление. Мобилизация клеток и клинические эффекты. М.: Бином. 240 с. (Belotsky S. M., Avtalion R. R. 2008. Inflammation. Cell mobilization and clinical effects. Moscow: Binom. 240 p.)
- Маянский А. Н. 2006. Патогенетическая микробиология. Нижний Новгород: Изд-во Нижегород. гос. мед. акад. 520 с. (Mayansky A. N. 2006. Pathogenic microbiology. Nizhny Novgorod: Med. Acad. Ed. 520 p.)
- Маянский А. Н., Пикуза О. И. 1993. Клинические аспекты фагоцитоза. Казань: Магариф. 192 с. (Mayansky A. N., Pikuza O. I. 1993. The clinical aspects of phagocytosis. Kazan: Magarif. 192 p.)
- Нестерова И. В., Колесникова Н. В., Чудилова Г. А., Ломтатидзе Л. В., Ковалева С. В., Евглевский А. А., Нгуен Т. З. Л. 2017. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм. Ч. 1. Инфекция и иммунитет. 7 (3): 219—230. (Nesterova I. V., Kolesnikova N. V., Chudilova G. A., Lomtadidze L. V., Kovaleva S. V., Evglevsky A. A., Nguyen T. Z. L. 2017. The new look at neutrophilic granulocytes: rethinking old dogmas. Pt 1. Infection and Immunity. 7 (3): 219—230.)
- Пигаревский В. Е. 1988. Клиническая морфология нейтрофильных гранулоцитов. Л.: Наука. 142 с. (Pigarevsky V. E. 1988. The clinical morphology of neutrophil granulocytes. Leningrad: Science. 142 p.)
- Плескова С. Н. 2011. Атомно-силовая микроскопия в биологических и медицинских исследованиях. Долгопрудный: Интеллект. 184 с. (Pleskova S. N. 2011. Atomic-force microscopy in biology and medicine. Dolgoprudny: Intellect. 184 p.)
- Плескова С. Н., Звонкова М. Б., Гущина Ю. Ю. 2005. Исследование морфологических параметров нейтрофильных гранулоцитов методом сканирующей зондовой микроскопии. Морфология. Арх. анат., гистол. и эмбриол. 127 (1): 60—62. (Pleskova S. N., Zvonkova M. B., Gushchina Yu. Yu. 2005. Studying of the neutrophil granulocytes morphological characteristics by scanning probe microscopy. Morphology. Arch. Anat. Histol. embryol. 127 (1): 60—62.)
- Подосинников И. С., Нилова Л. Г., Бабиченко И. В., Турина О. П., Пономарева В. Н. 1981. Метод определения хемотаксической активности лейкоцитов. Лаб. дело. 8: 468—470. (Podosinnikov I. S., Nilova L. G., Babichenko I. V., Turina O. P., Ponomareva V. N. 1981. Method for determining the chemotactic activity of leukocytes. Lab. Work. 8: 468—470.)
- Хейхоу Ф. Г. Дж., Кваглино Д. 1983. Гематологическая цитохимия. М.: Медицина. 320 с. (Heyhou F. G. J., Kvaglino D. 1983. Hematological cytochemistry. Moscow: Medicine. 320 p.)
- Шубич М. Г., Нагоев Б. С. 1980. Щелочная фосфатаза лейкоцитов в норме и патологии. М.: Медицина. 41 с. (Shubich M. G., Nagoyev B. S. 1980. Alkaline phosphatase of leukocytes in norm and pathology. Moscow: Medicine. 41 p.)
- Ackerman G. A. 1952. A modification of the Sudan black B technique for the possible cytochemical demonstration of masked lipids. J. Nat. Cancer Inst. 13: 219—220.
- Arancibia S. A., Beltrán C. J., Aguirre I. M., Silva P., Peralta A. L., Malinarich F., Hermoso M. A. 2007. Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. Biol. Res. 40: 97—112.
- Brown G. C., Vilalta A., Fricker M. 2015. Phagoptosis — cell death by phagocytosis — plays central roles in physiology, host defense and pathology. Curr. Mol. Med. 15: 842—851.
- Bukharaev A. A., Mozhanova A. A., Nurgazizov N. I., Ovchinnikov D. V. 2003. Measuring local elastic properties of cell surfaces and soft materials in liquid by atomic force microscopy. Physics of Low-Dimensional Structures. 3—4: 31—38.
- Burstone M. S. 1958. Histochemical demonstration of acid phosphatases with naphthol AS-phosphates. J. Nat. Cancer Inst. 21: 523—539.
- Edmondson K. E., Denney W. S., Diamond S. L. 2005. Neutrophil-bead collision assay; pharmacologically induced changes in membrane mechanics regulate the PSGL-1/P-selectin adhesion lifetime. Biophys. J. 89: 3603—3614.
- Fritz-Laylin L. K., Riel-Mehan M., Chen B. C., Lord S. J., Goddard T. D., Ferrin T. E., Nicholson-Dykstra S. M., Higgs H., Johnson G. T., Betzig E., Mullins R. D. 2017. Actin-based protrusions of migrating neutrophils are intrinsically lamellar and facilitate direction changes. Elife. Doi: 10.7554/eLife.26990.
- Leithner A., Eichner A., Muller J., Reversat A., Brown M., Schwarz J., Merrin J., de Gorter D. J., Schur F., Bayerl J., de Vries I., Wieser S., Hauschild R., Lai F. P., Moser M., Kerjaschki D., Rottner K., Small J. V., Stradal T. E., Sixt M. 2016. Diversified actin protrusions promote environmental exploration but are dispensable for locomotion of leukocytes. Nature Cell Biol. 18: 1253—1259.
- Loomis W. F., Fuller D., Gutierrez E., Groisman A., Rappe W. J. 2012. Innate non-specific cell substratum adhesion. PLoS ONE. 7. Doi: 10.1371/journal.pone.0042033.
- Lu T., Porter A. R., Kennedy A. D., Kobayashi S. D., DeLeo F. R. 2014. Phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus* by human neutrophils. J. Innate. Immun. 6: 639—649.
- Møller A. S., Ovstebo R., Haug K. B., Joø G. B., Westvik A. B., Kierulf P. 2005. Chemokine production and pattern recognition receptor (PRR) expression in whole blood stimulated with pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Cytokine. 32: 304—315.
- Pleskova S. N., Gushchina Yu. Yu., Zvonkova M. B. 2004. Investigation of the influence of complement system on the various strains of *Proteus* by methods of atomic force microscopy and luminol-dependent chemiluminescence. Physics of Low-Dimensional Structures. 1—2: 77—82.
- Ryter A., De Chastellier C. 1983. Phagocyte—pathogenic microbe interactions. Int. Rev. Cytol. 85: 287—327.
- Seimon T. A., Obstfeld A., Moore K. J., Golenbock D. T., Tabas I. 2006. Combinatorial pattern recognition receptor signaling alters the balance of life and death in macrophages. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 103: 19 794—19 799.
- Vandenbroucke-Grauls C. M., Thijssen H. M., Verhoef J. 1987. Opsonization of *Staphylococcus aureus* protects endothelial cells from damage by phagocytosing polymorphonuclear leukocytes. Infection and Immunity. 55: 1455—1460.
- Van Kessel K. P., Bestebroer J., van Strijp J. A. 2014. Neutrophil-mediated phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. Front. Immunol. 5. Doi: 10.3389/fimmu.2014.00467.
- Vargas P., Maiuri P., Bretou M., Sáez P. J., Pierobon P., Maurin M., Chabaud M., Lankar D., Obino D., Terriac E., Raab M., Thiam H. R., Brocker T., Kitchen-Goosen S. M., Alberts A. S., Sunareni P., Xia S., Li R., Voituriez R., Piel M., Lennon-Duménil A. M. 2016. Innate control of actin nucleation determines two distinct migration behaviours in dendritic cells. Nature Cell Biol. 18: 43—53.
- Yang C. W., Strong B. S., Miller M. J., Unanue E. R. 2010. Neutrophils influence the level of antigen presentation during the immune response to protein antigens in adjuvants. J. Immunol. 185: 2927—2934.
- Yang C., Wang L., Jia Z., Yi Q., Xu Q., Wang W., Gong C., Liu C., Song L. 2017. Two short peptidoglycan recognition proteins from *Crassostrea gigas* with similar structure exhibited different PAMP binding activity. Develop. Comp. Immunol. 70: 9—18.



FEATURES OF PHAGOCYTOSIS OF OPSONIZED AND NONOPSONIZED BACTERIA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* AND *ESCHERICHIA COLI* BY HUMAN NEUTROPHIL GRANULOCYTES, STUDIED BY ATOMIC FORCE MICROSCOPY

S. N. Pleskova,<sup>1,2,\*</sup> R. N. Kriukov,<sup>1</sup> E. V. Razumkova,<sup>1,2</sup> S. Yu. Zubkov,<sup>1</sup> N. V. Abarbane<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Research and Education Centre for «Physics of Solid State Nanostructures»,  
N. I. Lobachevsky Nizhny Novgorod State University, Nizhny Novgorod, 603950, and

<sup>2</sup> Department of Nanotechnology and Biotechnology,  
R. E. Alekseev Nizhny Novgorod State Technical University, Nizhny Novgorod, 603950;  
\* e-mail: pleskova@mail.ru

The differences in the process of the phagocytosis of opsonized and nonopsonized *Staphylococcus aureus* 2879 M and *Escherichia coli* 321 were studied. The differences in the features of pseudopodia in phagocytosis of opsonized and nonopsonized bacteria by neutrophil granulocytes (NG) were identified, while the differences in the features of pseudopodia in reactions on gram-positive and gram-negative microorganisms were not detected. A change of the nuclei volume, their movement, fluctuations in the nucleuses inter-segment distance, and an insignificant increase of the volume of NG on the late stages of phagocytosis were observed for the first time in dynamic. For the first time a decrease of the rigidity of NG membrane-cytoskeleton complex, correlated with the intensity of phagocytosis and bacteria opsonization were observed. It was defined that the opsonization does not influence on the NG oxygen-dependent metabolism, but at the same time it is significantly influence on the oxygen-independent mechanisms.

Key words: neutrophil granulocytes, phagocytosis, opsonization, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, pseudopodia, atomic force microscopy, rigidity of the membrane-cytoskeleton complex

---