

УДК 539.611

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ АДГЕЗИОННЫХ КОНТАКТОВ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ И ЛИМФОЦИТОВ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

© 2020 г. С.Н. Плескова*, **, Р.Н. Крюков*, С.З. Бобык*, **, А.В. Боряков*, А.А. Брилкина*

*Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского
603950, Нижний Новгород, просп. Гагарина, 23/3

**Нижегородский государственный технический университет им. Р.Е. Алексеева
603950, Нижний Новгород, ул. Минина, 24/1

E-mail: pleskova@mail.ru

Поступила в редакцию 23.07.2019 г.

После доработки 23.07.2019 г.

Принята к публикации 27.11.2019 г.

Атомно-силовая микроскопия была использована для создания системы измерения межклеточных адгезионных контактов. Методом сканирующей электронной микроскопии была доказана эффективность использования поли-L-лизина для фиксации нейтрофилов и лимфоцитов на зонде. Было показано, что при фиксации одной клетки на зонде, а второй – на поверхности подложки можно проводить релевантные измерения сил межклеточной адгезии, используя режим FS-спектроскопии. Были измерены силы межклеточной адгезии между нейтрофилами и лимфоцитами. Для нейтрофилов она составила – 38.5 ± 13.7 пН, а для лимфоцитов – 35.6 ± 8.3 пН. Таким образом, адгезия между нейтрофилами статистически значимо выше адгезии, возникающей между лимфоцитами.

Ключевые слова: межклеточная адгезия, атомно-силовая микроскопия, FS-спектроскопия, нейтрофилы, лимфоциты, сканирующая электронная микроскопия.

DOI: 10.31857/S000630292001010X

Атомно-силовая микроскопия позволяет: 1) получать изображения отдельных клеточных структур и самих клеток с высоким разрешением; 2) осуществлять динамический мониторинг изменений клеток (деления, гибели, движения по субстрату, отдельных метаболических процессов) в режиме реального времени; 3) определять микромеханические свойства клеток, в том числе оценивать резерв ее механической прочности; 4) вносить в клетку или доставать из нее отдельные молекулы (например, РНК) не нарушая ее жизнеспособности; 5) определять наличие и укладку основных белков клеток; 6) оценить особенности свертки/развертки белков; 7) получать информацию о локализации и плотности экспрессии основных адгезинов; 8) изучать сенсомы; 9) разрезать вирусы; 10) связывать механические свойства белков с местом локализации на поверхности клетки; 11) исследовать молекулярные динамические процессы, протекающие с высокой скоростью методом высокоскоростной микроскопии [1]. Функционализация зондов ли-

гандами позволяет оценить силу лиганд-рецепторных белковых взаимодействий [2–4]. Таким образом, этот тип микроскопии является единственным, который позволяет не только визуализировать происходящие явления, но и активно моделировать различные экспериментальные процессы.

В пионерской работе [5] впервые были исследованы силы межклеточной адгезии на примере склонных к агрегации клеток *Dictyostelium discoideum* (клеточный слизевик, относящийся к типу Мусетосоа). Той же группой авторов была продемонстрирована действенность модели исследования адгезионных контактов клеток млекопитающих между рецептором VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$ integrin) лимфоцитов (метастазирующая меланома В 16) человека и рецептором VCAM-1, который экспрессируется на мембране эндотелия сосудов bEnd.3 [6]. Они установили, что сила специфического одномолекулярного контакта составляет 33 ± 12 пН. Аналогичные взаимодействия измерены между молекулой ICAM-1 эндотелиальных клеток и MUC-1 и CD43, экспрессируемых на клетках рака мочевого пузыря. Было

Сокращение: СФР – стерильный физиологический раствор.

установлено, что сила взаимодействия ICAM-1 и CD43 соответствовала 43 пН, а связывание между молекулами ICAM-1 и MUC-1 – около 53 пН [7].

Однако в клинической практике трудно выделить единичные молекулярные контакты в суммарной силе взаимодействия, возникающей между клетками в процессе межклеточной адгезии, агрегации и при других физиологических и патологических процессах. Тем не менее адгезионные контакты между целыми клетками крайне важны. В частности, дефициты адгезии нейтрофилов к эндотелию (например, впервые описанный иммунодефицит, связанный с генетическим дефектом CD18) сопровождаются тяжелыми рецидивирующими инфекциями, в том числе глубокими тканевыми абсцессами и нейтрофилией [8]. И напротив, гиперадгезия нейтрофилов к эндотелию, тромбоцитам и друг к другу является одним из патогенетических звеньев синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания и следствием септического процесса [9]. Поэтому важно разрабатывать системы, которые могли бы исследовать суммарную силу адгезионных контактов между клетками.

Целью данного исследования было использование режима спектроскопии в атомно-силовой микроскопии для разработки принципиально новой системы исследования сил межклеточной адгезии и измерение с помощью этой системы силы адгезионных контактов между нейтрофилами и лимфоцитами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали венозную кровь здоровых доноров обоих полов в возрасте 20–40 лет, полученную из Нижегородского областного центра крови им. Н.Я. Климовой. Кровь стабилизировали гепарином (25 ЕД/мл) и разводили забуференным физиологическим раствором, содержащим 0.137 М NaCl и 0.0027 М KCl, pH 7.35 (200 г, 3 мин) в соотношении 1:1. Для выделения нейтрофильной и лимфоцитарной фракции использовали двойной градиент фикола-урографина ($\rho_1 = 1.077$ г/мл, $\rho_2 = 1.117$ г/мл, 200 г, 40 мин) [10]. Полученные фракции раздельно отмывали забуференным физиологическим раствором (200 г, 3 мин), и использовали в конечной концентрации $1 \cdot 10^6$ кл/мл. Клетки брали в эксперимент сразу после выделения, жизнеспособность по тесту с трипановым синим составляла не менее 99%.

Клетки высаживали на Si_3N_4 -зонд (C-MSCT, Bruker, США), имеющий следующие характеристики: $f_0 = 4\text{--}10$ кГц, $k = 0.010$ Н/м. Предварительно кантилевер с зондом был обработан в течение 50 мин поли-L-лизинном (Merck, США), затем трехкратно отмыт 10 мкл стерильного

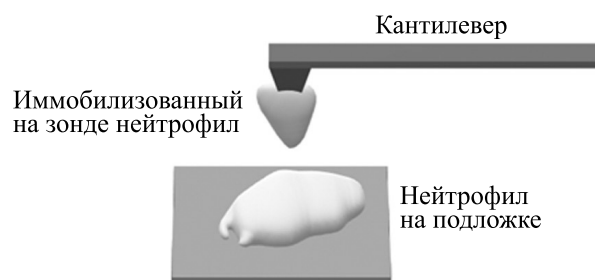


Рис. 1. Схема проведения эксперимента по изучению межклеточной адгезии: одна клетка фиксирована на зонде, вторая – на подложке. Обе клетки живые, поскольку все исследования ведутся в физиологических жидкостях.

физиологического раствора (СФР). После отмывки на кантилевер с зондом нанесли суспензию клеток (10 мкл), инкубировали 20 мин при 37°C и трижды отмывали СФР. Кантилевер устанавливали на головку с каплей СФР, которая обеспечивала жизнеспособность клетки во время короткого времени транспорта и погружения зонда в чашку Петри.

В стерильную чашку Петри (35 мм, Corning® Treated Culture Dishes, США) вносили 2 мл суспензии клеток, инкубировали для достижения спонтанной адгезии 20 мин при 37°C и трижды отмывали СФР. Затем «жидкостную ячейку» переносили на столик атомно-силового микроскопа NTegra (NT-MDT, Россия).

Силы межклеточной адгезии определяли методом FS-спектроскопии. Теоретические основы метода и его подробное описание изложены в работах [1,11,12]. Проводили выставление зонда над клеткой, под контролем оптического микроскопа, затем выполняли захват обратной связи в контактном режиме. После этого выставляли диапазон измерения высоты положения кантилевера над клеткой – 100–5000 нм. Сила прижатия варьировала в диапазоне 10–50% от максимально возможного, а время снятия кривой – от 2 до 60 с. После получения FS-кривой обратную связь отключали, чтобы не повредить клетки, проводили переход на новую область и процесс повторяли. Каждый образец подвергали исследованию в течение 1 ч. Далее проводили замену образцов как на зонде, так и на чашке Петри. Исследования проводили до получения 816 кривых.

Схема проведения эксперимента представлена на рис. 1.

По окончании эксперимента зонд с фиксированной на нем клеткой трижды отмывали СФР, клетку фиксировали глутаровым альдегидом (2.5%, 10 мин), отмывали трехкратно СФР, высушивали и исследовали методом сканирующей электронной микроскопии, доказывающим ее присутствие на поверхности зонда.

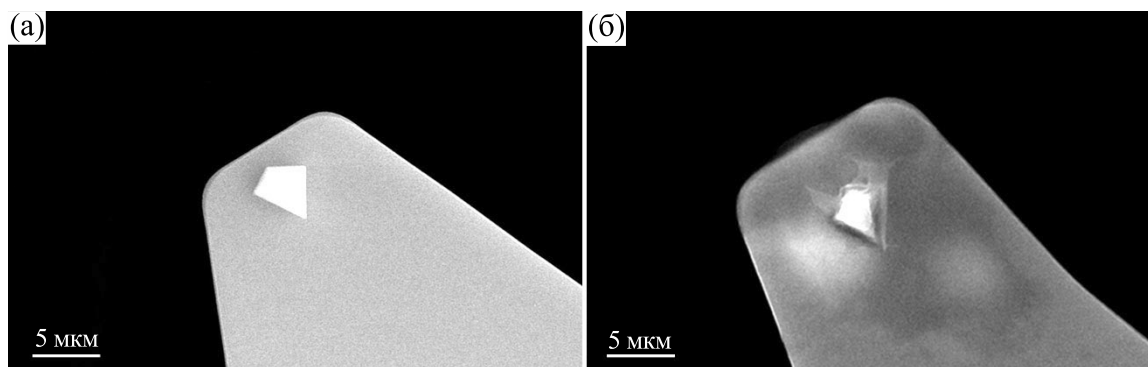


Рис. 2. Изображение, полученное методом сканирующей электронной микроскопии: (а) – интактный зонд, имеет четкие грани и форму, близкую к пирамидальной; (б) – нейтрофил, расположенный на кончике зонда (после сканирования нейтрофил был фиксирован 2.5%-м глутаровым альдегидом. Ядро нейтрофила расположено на вершине зонда, цитоплазматическая часть тесно связана с поверхностью кантилевера. Сам зонд не деформирован, его размеры форма и характер вершины не изменены.

Электронно-микроскопическое исследование зондов проводили на электронном микроскопе JSM-IT300LV (JEOL, Япония) в режиме высокого вакуума при ускоряющем напряжении 20 кВ и токе зонда не более 0.25 нА для минимизации воздействия тока на образцы, разрешение составляло не менее 10 нм. Изображения были получены одновременно в низкоэнергетичных вторичных электронах и отраженных электронах.

Статистическую обработку проводили в программе Origin 8.0 (Origin Lab Corp., США). Определяли границы нормального распределения количественных показателей выборок с использованием критерия Шапиро–Уилка. Поскольку распределения не соответствовали критериям нормальности, определяли медиану и 25-й процентиль. Для сравнения двух выборок использовали непараметрический критерий Вилкоксона.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе доказывалась эффективность поли-L-лизина для фиксации клетки на зонде. На рис. 2 представлены результаты исследований методом сканирующей электронной микроскопии. Рис. 2а показывает, что зонд без обработки имеет четкую геометрию призмы, поверхность кантилевера чистая, свободная от органики. На рис. 2б видно, что после обработки зонда и кантилевера поли-L-лизином клетка надежно закрепляется на зонде. Нейтрофил оказывается фиксированным на зонде, причем его цитоплазматическая часть зафиксирована на кантилевере, тогда как ядросодержащая часть фиксируется непосредственно на вершине зонда.

На втором этапе проводили сканирование клеток на поверхности чашки Петри в СФР в витальном состоянии. На рис. 3 представлен результат сканирования лимфоцита и нейтрофила в на-

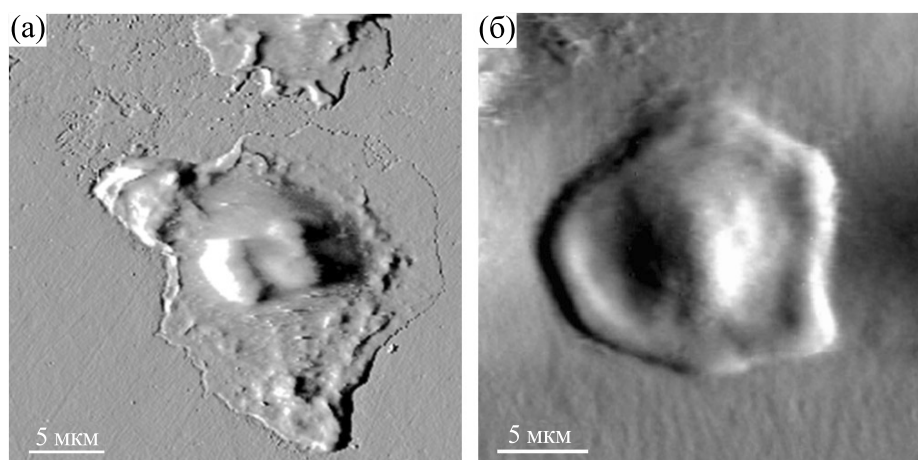


Рис. 3. Живые интактные клетки, адгезированные на поверхности чашки Петри в результате процесса самопроизвольной адгезии: (а) – нейтрофил, (б) – лимфоцит.

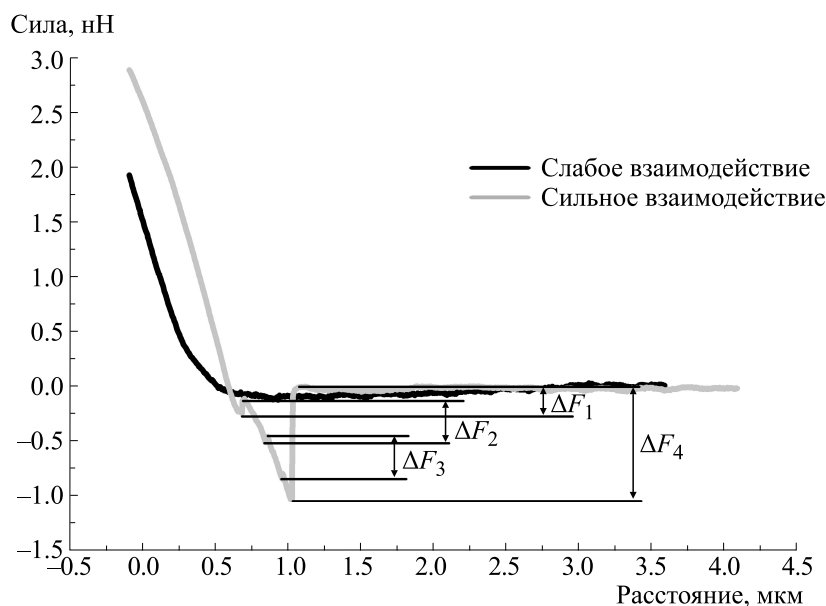


Рис. 4. Кривые отвода при взаимодействии двух нейтрофилов: один иммобилизован на зонде, второй — адгезирован на поверхности чашки Петри. Серая кривая — соответствует выраженному адгезионному контакту между двумя клетками, черная кривая — слабому взаимодействию между двумя клетками.

тивном состоянии. Концентрацию клеток подбирала таким образом, чтобы они располагались близко друг к другу, чтобы облегчить позиционирование зонда при проведении FS-спектроскопии. Внесение дополнительных закрепляющих агентов на чашку Петри не требовалось, поскольку и нейтрофилы и лимфоциты имеют высокую собственную адгезионную активность и прочно прикрепляются к пластику. Нейтрофил на рис. 3 имеет типичную морфологию: сегментированное ядро и хорошо распластанную цитоплазматическую часть, в которой четко видны гранулы. Представленная на рис. 3 клетка относится к хорошо распластанным [13]. Очевидны морфологические различия между лимфоцитом и нейтрофилом: лимфоцит имеет ровное округлое ядро, меньший размер и высокоразвитую мембранную поверхность.

В результате проведения FS-спектроскопии получили силовые кривые. На рис. 4 представлены кривые отвода кантилевера от поверхности клетки. На них четко визуализируются скачки («ступени»). Каждая ступень соответствует разрыву связей между рецепторами клетки находящейся на зонде и рецепторами, экспрессирующимися на мембране нейтрофила, адгезированного на чашке Петри.

Были рассчитаны силы всех адгезионных контактов, возникающих между клетками, как разница между начальным уровнем и максимальной

точкой «ступени». Результаты расчета представлены на рис. 5.

Медианные значения сил межклеточной адгезии составили для нейтрофилов 38.5 ± 13.7 пН, для лимфоцитов — 35.6 ± 8.3 пН. Статистический анализ позволил опровергнуть «0»-гипотезу и показал, что различия между силами межклеточной адгезии у нейтрофилов и лимфоцитов статистически значимы ($W = 148823.5$; $Z = -2.0279$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Из рис. 4 следует, что характер силовых кривых был разным. Например, черная кривая соответствует минимальному взаимодействию между клетками, тогда как серая — обычному взаимодействию, сопровождающемуся многочисленными рецепторными контактами. Нулевой уровень соответствует отсутствию взаимодействия между клетками (релаксированный кантилевер), а работа адгезии может быть оценена как площадь под кривой отвода по следующей формуле:

$$A_{ад} = \int F dl,$$

где F — сила взаимодействия клеток, Н; l — расстояние между клетками, м.

Для черной кривой интеграл площади между нулевой силой и кривой составлял < 100 аДж, тогда как о наличии большого количества рецепторных контактов можно говорить при достиже-

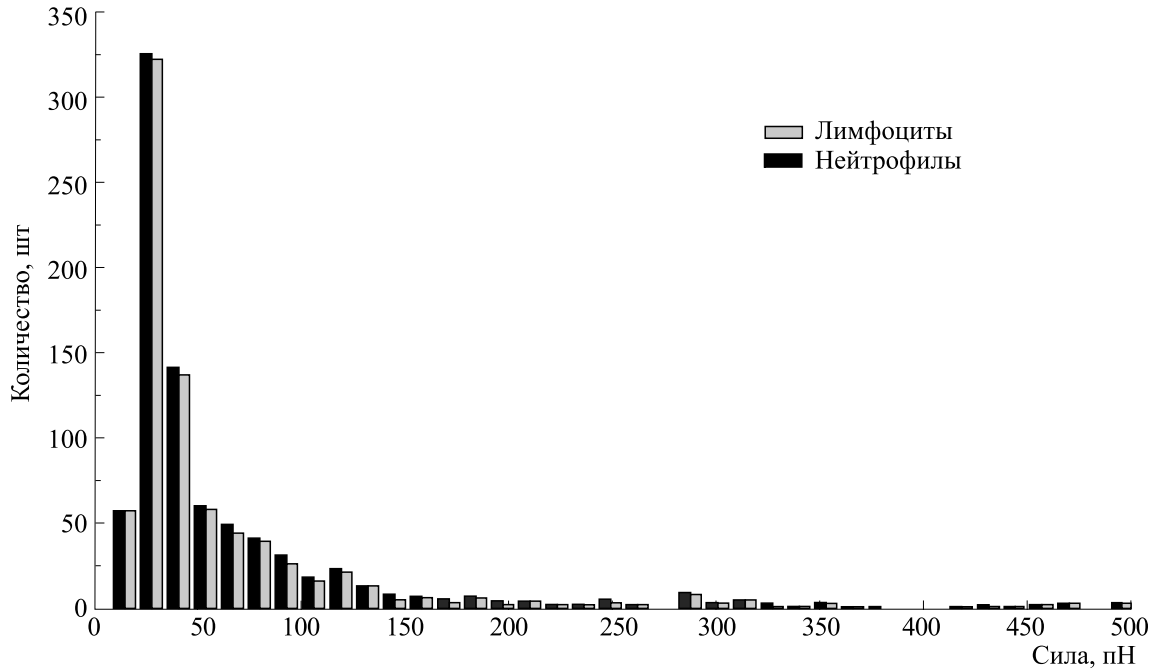


Рис. 5. Распределения сил адгезионных контактов, возникающих между клетками.

нии работы адгезии ≥ 100 аДж (в случае, описанном на рис. 4 она составила ~ 500 аДж).

Анализ серой кривой показывает, что характер рецепторного связывания не однороден. На мембране нейтрофилов экспрессируется большое число рецепторов, принимающих участие в адгезии: E-, P- и L-селектины, ICAM-1, VCAM-1, CD11a/CD18, CD11b/CD18, $\alpha_v\beta_2$ -интегрины, а на мембране лимфоцитов – VLA-4 (и ряд других интегринов, например, CD103/ β_7), CD11a/CD18, MAdCAM-1 [14].

Поэтому каждая ступень может соответствовать как разрыву единичных рецептор-рецепторных связей, так и нескольким рецепторных связей между клетками. Достоверно определить разрыв единичного рецептор-рецепторного взаимодействия в данной системе невозможно, поскольку всегда будет существовать вероятность разрыва нескольких связей в интервал времени меньший, чем возможно разрешить аппаратно. Для оценки работы адгезии в системе молекулярных связей на уровне единичных рецепторов необходимо использовать другую систему: зонд, функционализированный отдельной молекулой, фиксированной через линкер, и клетку либо единичную молекулу, фиксированную на подложке [15].

Очевидно, что высокие ступени, например ΔF_4 , составлены из множества маленьких ступе-

ней. С учетом разного количества рецепторов каждого класса (интегрины, селектины и так далее), экспрессируемых на мембранах, и разной аффинности этих рецепторов, а также учитывая возможное неспецифическое взаимодействие между клетками, суммарную силу адгезионных контактов между клетками можно рассчитать по следующей формуле:

$$\Delta F_k = a \cdot f_1 + b \cdot f_2 + \sum_i c_i \cdot f_i + C,$$

где ΔF_k – высота k -ступеньки силовой кривой отвода; a, b, c_i – количество рецепторов различных типов; f_1, f_2, f_i – силы разрыва между рецепторами различных типов; C – неспецифическое взаимодействие.

Нужно учитывать и тот факт, что характер распределения рецепторов на поверхности неоднороден, поскольку они могут располагаться как поодиночке, так и формировать «рецепторные поля» как, например, наблюдается в иммунологических синапсах. Формирование рецепторных полей происходит на основе рафтов – особых мембранных структур, которые представляют собой специализированную платформу, контролирующую большое количество клеточных функций [16]. Но и в самих рафтах характер распределения рецепторов неоднороден. Различают три основных варианта поведения рецепторов в раф-

тах: 1) рецепторы ассоциируются в устойчивом состоянии с липидными рафтами и могут быть активированы связыванием с лигандами; 2) индивидуальные рецепторы со слабой аффинностью к рафтам олигомеризуются лигандным связыванием, и это приводит к увеличению времени пребывания в рафте; 3) активированные рецепторы рекрутируются перекрестно-связывающими протеинами в соседние рафты, и это приводит к коалесценции платформ [17]. Эти факты делают оценку рецепторных взаимодействий еще более сложной. Возможно, в том случае, если рецепторы сконцентрированы в виде рецепторных полей на рафтах, мы получаем большие ступени >100 пН, а в тех случаях, когда речь идет о более слабых взаимодействиях между рецепторами на внерафтовой части мембраны величина одиночных ступеней уменьшается до 30–60 пН. Нельзя также полностью исключить возможность олигомеризации рецепторов, экспрессируемых на мембране клетки, фиксированной на зонде, от первичного взаимодействия с клеткой на подложке и рекрутинг рецепторов в рафт после первичного взаимодействия.

На рис. 5 распределение ограничено 500 пН, однако при измерениях максимальное регистрируемое значение составило 2400 пН. Распределение сил адгезионных контактов представляет собой ассиметричную кривую с максимумом в районе 30–40 пН для обоих типов клеток. Тем не менее распределение сил адгезионных контактов статистически отличается у нейтрофильных гранулоцитов и лимфоцитов, что говорит о различиях в рецепторных полях этих типов клеток.

Таким образом, при фиксации одной клетки на поверхности зонда поли-L-лизинном и связывании другой клетки на поверхности чашки Петри можно получить действенную систему измерения сил межклеточной адгезии. Поскольку происходит постепенное отведение зонда от поверхности клетки, регистрируются все силы межклеточного взаимодействия от слабых (предположительно неспецифических), лежащих в районе 10 пН, до сильных (предположительно, формируемых обширными рецепторными полями, из-за которых разорвать контакты при отведении зонда труднее), лежащих в диапазоне от 100 до 2400 пН. Подавляющее большинство связей определялось в районе 30–40 пН, что, на наш взгляд, соответствует силе единичных рецепторных взаимодействий.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-14-10179).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование было одобрено Комиссией по биоэтике ННГУ им. Н.И. Лобачевского (создана 11.11.16 г., приказ о создании № 497-ОД), протокол № 9 от 17.07.17 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. С. Н. Плескова, *Атомно-силовая микроскопия в биологических и медицинских исследованиях* (Издательский дом «Интеллект», Долгопрудный, 2011).
2. H. Kim, H. Arakawa, T. Osada, et al., *Ultramicroscopy* **97** (1–4), 359 (2003).
3. L. A. Chtcheglova, L. Wildling, J. Waschke, et al., *J. Mol. Recognition* **23**, 589 (2010).
4. L. Xiao, Q. Chen, Y. Wu, et al., *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes* **1848** (10), 1988 (2015).
5. M. Benoit, D. Gabriel, G. Gerisch, et al., *Nat. Cell Biol.* **2** (6), 313 (2000).
6. R. H. Eibl and M. Benoit, *IEE Proc. Nanobiotechnol.* **151** (3), 128 (2004).
7. V. S. Rajan, V. M. Laurent, C. Verdier, et al., *Biophys. J.* **112**, 1246 (2017).
8. M. C. Dinauer, *Blood* **133** (20), 2130 (2019).
9. S. Gando, T. Kameue, N. Matsuda, et al., *Thromb. Res. J.* **116** (2), 91 (2004).
10. M. T. Aguado, N. Pujol, E. Rubiol, et al., *J. Immunol. Methods* **32**, 41 (1980).
11. E. A. Hassan, W. F. Heinz, M. D. Antonik, et al., *Biophys. J.* **74**, 1564 (1998).
12. A. A. Bukharaev, A. A. Mozhanova, N. I. Nurgazizov, et al., *Phys. Low-Dim. Struct.* **3**, 31 (2003).
13. С. Н. Плескова, М. Б. Звонкова и Ю. Ю. Гушина, *Морфология. Архив анатомии, гистологии и эмбриологии* **127** (1), 60 (2005).
14. С. М. Белоцкий и Р. Р. Авталион, *Воспаление. Мобилизация клеток и клинические эффекты* (БИНОМ, М., 2008).
15. H. Yang, J. Yu, G. Fu, et al., *Exp. Cell Res.* **313** (16), 3497 (2007).
16. С. Н. Плескова и Е. Е. Пудовкина, *Цитология* **55** (8), 586 (2013).
17. K. Simons and D. Toomre, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1** (1), 31 (2000).

Investigation of the Adhesive Intercellular Contacts between Neutrophil Granulocytes and Lymphocytes by Atomic Force Microscopy

S.N. Pleskova^{*, **}, R.N. Kriukov^{*}, S.Z. Bobyk^{*, **}, A.V. Boryakov^{*}, and A.A. Brilkina^{*}

**National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod,
prosp. Gagarina 23/3, Nizhni Novgorod, 603950 Russia*

***Nizhny Novgorod State Technical University named after R.E. Alekseev,
ul. Minina 24/1, Nizhni Novgorod, 603950 Russia*

Atomic force microscopy was used to create a system for measuring intercellular adhesion. Scanning electron microscopy was applied to confirm that poly-L-lysine is the best for fixation of neutrophil granulocytes and lymphocytes on the tip. It was shown that when one cell is fixed on the tip and the other one on the substrate surface, it is possible to carry out relevant measurements of intercellular adhesion forces by FS spectroscopy. Intercellular adhesion forces of neutrophils and lymphocytes were measured. The adhesion forces of neutrophils and lymphocytes were: 38.5 ± 13.7 pN and 35.6 ± 8.3 pN, respectively. Thus, adhesion of neutrophils is statistically significantly higher than adhesion of lymphocytes.

Keywords: intercellular adhesion, atomic force microscopy, FS spectroscopy, neutrophils, lymphocytes, scanning electron microscopy