

БИОЛОГИЯ

УДК 616.155.34]:546.173+546.215+57.086

М. Н. СТАРОДУБЦЕВА¹, Е. И. КОВАЛЕНКО²,
член-корреспондент С. Н. ЧЕРЕНКЕВИЧ²

СТРУКТУРНАЯ ДИНАМИКА АКТИВИРОВАННЫХ ПЕРОКСИНИТРИТОМ НЕЙТРОФИЛОВ

¹Гомельский государственный медицинский университет,
²Белорусский государственный университет, Минск

Поступило 24.04.2008

Введение. Одной из важнейших клеток системы врожденного иммунитета, осуществляющей первую линию защиты организма от патогенных микроорганизмов, является нейтрофил. Пероксинитрит (ONOO⁻), один из представителей семейства активных форм азота, генерируется нейтрофилами в процессе выполнения ими основной функции – уничтожения микроорганизмов [1, 2]. Пероксинитрит образуется в реакции NO, продукта NO-синтазы, и O₂⁻, продукта НАДФН-оксидазы. Концентрация пероксинитрита внутри фаголизосом нейтрофилов и вблизи активированных нейтрофилов может достигать сотен микромолей, что существенно превышает уровень этого агента, измеряемый в других клетках и тканях [1–3]. В литературе встречаются противоречивые данные о роли пероксинитрита в регулировании функций нейтрофилов, включая их адгезию и хемотаксис [3–5]. Атомно-силовая микроскопия (АСМ) – новый метод исследования структурных и механических свойств поверхностей в мезоскопическом масштабе – только в последние годы применяется для изучения свойств биологических объектов, включая отдельные клетки [6].

Цель данной работы – изучение динамики структуры поверхности и формы нейтрофилов, обработанных экзогенным пероксинитритом, с помощью методов атомно-силовой микроскопии.

Материалы и методы. *Выделение нейтрофилов, обработка нейтрофилов пероксинитритом и подготовка клеток для АСМ-исследования.* Нейтрофилы выделяли из периферической крови здоровых доноров по методу, описанному в работе [7]. Венозную гепаринизированную кровь инкубировали в присутствии декстрана Т-500. Взвесь клеток над слоем осевших эритроцитов разделяли в градиенте плотности фиколл-верографина. Примесь эритроцитов удаляли при помощи осмотического шока в холодной дистиллированной воде. Клетки ресуспендировали в фосфатном буфере (60 мМ Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 83 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ CaCl₂, pH 7,4). Содержание нейтрофилов в суспензии клеток было не менее 96%.

Пероксинитрит получали в реакции NaNO₂ и H₂O₂ в кислых водных растворах с последующим быстрым их защелачиванием [8]. Для этого 100 мл 1,2 М NaNO₂ быстро смешивали со 100 мл раствора H₂O₂ (10 мл 30% H₂O₂, 60 мл 1 М HNO₃, 30 мл H₂O) и к полученной смеси добавляли 100 мл 1,5 М NaOH. Избыток H₂O₂ удаляли фильтрацией раствора пероксинитрита через гранулированный MnO₂. Раствор пероксинитрита замораживали и хранили при температуре минус 20 °С в течение 3–7 дней, затем использовали его верхний (желтый) слой в качестве рабочего раствора пероксинитрита. Концентрацию пероксинитрита определяли спектрофотометрически ($\epsilon_{302\text{nm}} = 1670 \text{ см}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$). Нейтрофилы обрабатывали пероксинитритом в различных концентрациях – от 1 мкМ до 1 мМ в течение 10 мин (опытные образцы). Контрольными образцами служили суспензии нейтрофилов без какой-либо обработки или клеточные суспензии, обработанные водным раствором 0,5 М NaOH в объеме, соответствующем объему пероксинитрита в опытных образцах. Затем клетки наносили на обезжиренную стеклянную поверхность, инкубировали в течение 5–180 мин, не допуская высушивания образцов. После этого клетки фиксировали 1%-ным глутаровым альдегидом в течение 30 мин, отмывали буферным раствором и дистиллированной водой и высушивали при комнатной температуре. Морфологический анализ клеточной популяции проводили с помощью световой микроскопии (окраска по Романовскому-Гимзе).

АСМ клеток крови и анализ данных АСМ. АСМ-исследования проводили на атомно-силовом микроскопе «НТ-206» («МикроТестМашины», Беларусь) в контактном режиме сканирования с использованием игл типа CSC38 («MicroMash»), размещенного в ЦНИЛ Гомельского государственного медицинского университета. Регистрировали топографию, карты вертикальных отклонений острия АСМ-зонда и карты латеральных сил поверхности клеток. Для количественной оценки структуры клеточной поверхности был проведен фрактальный анализ карт латеральных сил площадью от $0,5 \times 0,5$ мкм до 6×6 мкм с разрешением 256×256 пикселей. Фрактальная размерность рассчитана с использованием программы «SurfaceXplore 1.3.11» («МикроТестМашины», Беларусь). Для расчета фрактальной размерности был использован метод «площадь-периметр» с делением поверхности на 200 горизонтальных слоев.

Статистический анализ данных. Результаты измерений представлены в виде границ доверительного интервала с доверительной вероятностью 95%. Символ n обозначает размер выборки. Сравнения выборочных характеристик проводили с использованием t -критерия Стьюдента для независимых групп и критерия Фишера.

Результаты и их обсуждение. При взаимодействии со стеклянной поверхностью нейтрофилы изменяют свою форму с шарообразной на куполообразную, появляется прикраевой слой и отростки (ламеллоподии и филоподии), клетки уплощаются (рис. 1). Происходит перестройка структуры нейтрофила. Результаты АСМ-анализа формы и структуры активированных пероксинитритом нейтрофилов позволили выделить несколько типов клеток с характерными стадиями их взаимодействия с субстратом и программой их гибели. Всего выделено 4 основных типа нейтрофилов (рис. 1 и 2). Типы нейтрофилы различаются, в первую очередь, по геометрическим параметрам (таблица). К 1 типу отнесены клетки, слабо взаимодействующие с подложкой, со значением отношения диаметра клетки к ее высоте (параметр D/h) меньше 6,5. Для клеток 2 типа параметр D/h находился в диапазоне от 6,5 до 12,5, а для 3 типа клеток он был больше 12,5 (таблица). Очевидно, что параметр D/h характеризует процесс адгезии нейтрофилов к субстрату (распластывания). Четвертый тип нейтрофилов характеризуется значением параметра D/h , промежуточным между его значениями для 2 и 3 типа клеток. Для не активированных нейтрофилов этот тип клеток встречается крайне редко.

Выделенные типы клеток различаются не только по форме, но и по структуре поверхности. Для клеток 1 типа характерны мелкие неоднородности рельефа поверхности диаметром до 500 нм и высотой до 50 нм (средний диаметр – $214,4 \pm 27,8$ нм; высота – $23,0 \pm 3,3$ нм, $n = 171$). Структурными элементами нейтрофилов, учет которых может объяснить наличие на поверхности клеток неоднородностей подобных размеров, являются мелкие гранулы нейтрофилов (специфические гранулы, желатиназные гранулы и секреторные пузырьки) и ячейки актинового цитоскелета, расположенного в непосредственной близости к плазматической мембране. Для 2 типа нейтрофилов характерна выраженная гранулированная структура поверхности. Распределение неоднородностей рельефа клеточной поверхности по размерам (диаметрам) является бимодальным с модами: 200 и 600 нм (среднее значение диаметра второй субпопуляции гранул нейтрофилов – $602,5 \pm 48,3$ нм, высоты – $81,2 \pm 8,8$ нм, $n = 101$). К 3 типу клеток относятся клетки с крупнозернистой структурой поверхности. Среднее значение диаметра гранул (зерен) равно $913,1 \pm 76,4$ нм, а высоты – $138,3 \pm 22,6$ нм, $n = 45$.

Тонкая структура поверхности нейтрофилов различных типов была проанализирована с помощью карт латеральных сил участков поверхности клеток и оценена с использованием фрактальной размерности. Карты латеральных сил, анализируемые совместно с топографией поверхности, несут в себе информацию не только о геометрических особенностях поверхности, но и о структуре биологического композита (плазматической мембраны и подлежащего цитоскелета) [9, 10]. Наши исследования выявили различия в характере зависимости фрактальной размерности карт латеральных сил участков клеточной поверхности от площади области сканирования для трех первых типов нейтрофилов. Для этих типов клеток фрактальная размерность уменьшалась с уменьшением площади сканирования. При этом установлено, что для клеток 3 типа (гранулированная поверхность) уменьшение фрактальной размерности было более резким с уменьшением области сканирования по сравнению с такой же зависимостью для клеток 1 типа (сглаженная поверхность). Различия в величинах фрактальной размерности для участков поверхности размером 4×4 мкм (D_{F4}) и 1×1 мкм (D_{F1}) для выборки клеток 3 типа были статистически значимыми ($D_{F4} = 2,90 \pm 0,07$, $D_{F1} = 2,73 \pm 0,04$, $p = 0,002$, $n = 6-15$), тогда как для клеток 1 типа значимых различий не выявлено ($D_{F4} = 2,89 \pm 0,09$, $D_{F1} = 2,85 \pm 0,04$, $p > 0,05$, $n = 10-17$).

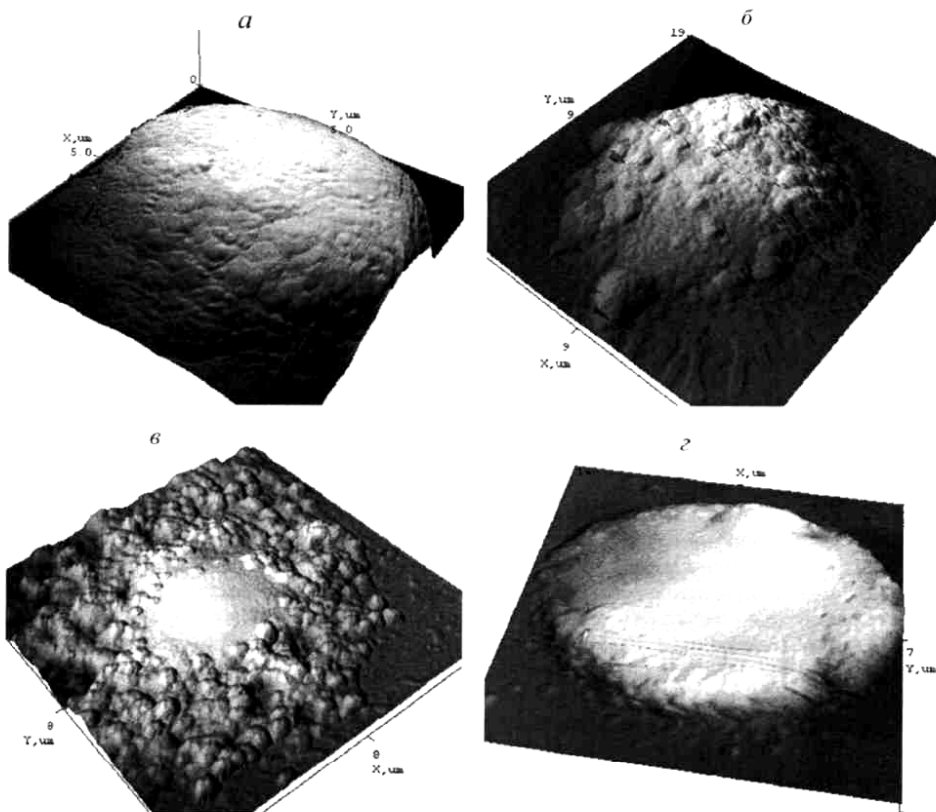


Рис. 1. АСМ-изображения различных типов нейтрофилов, активированных пероксинитритом, при их адгезии к стеклянной поверхности: 1 тип (*a* – размер области сканирования $10 \times 10 \text{ мкм}^2$), 2 тип (*б* – размер области сканирования $18,8 \times 18,8 \text{ мкм}^2$), 3 тип (*в* – размер области сканирования $16,2 \times 16,2 \text{ мкм}^2$), 4 тип (*г* – размер области сканирования $14,5 \times 14,5 \text{ мкм}^2$)

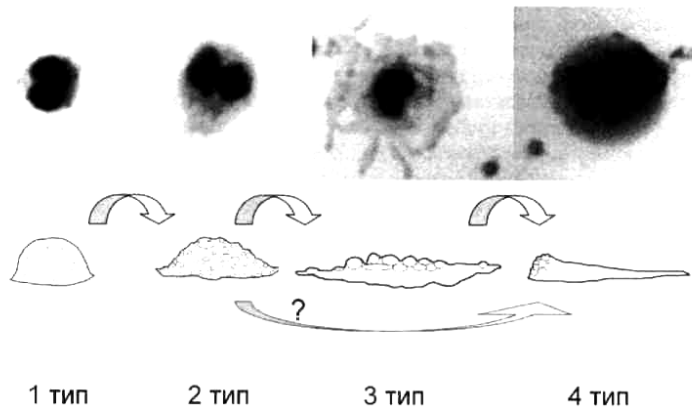


Рис. 2. Схема трансформации активированных пероксинитритом нейтрофилов различных типов при их адгезии к стеклянной поверхности (изображения подкрашенных нейтрофилов, полученные методом световой микроскопии, представлены в верхнем ряду)

Геометрические параметры нейтрофилов разных типов

Тип	D , мкм	h , мкм	D/h	n (клеток)
1	$9,2 \pm 0,8$	$2,6 \pm 0,3$	$3,4 \pm 0,6$	8
2	$10,3 \pm 3,3$	$1,0 \pm 0,3$	$10,3 \pm 1,5$	8
3	$16,3 \pm 0,8$	$0,62 \pm 0,03$	$26,6 \pm 1,0$	5
4	$14,8 \pm 1,0$	$1,0 \pm 0,1$	$16,2 \pm 2,7$	8

Четвертый тип клеток характеризовался неравномерным распределением структур на поверхности: наблюдалось скопление гранул в одном или нескольких участках, в то время как остальная часть поверхности клетки была гладкой (рис. 1, z). Фрактальная размерность карт латеральных сил поверхности клетки для гладких участков размером 1×1 мкм близка к 3, а гранулированных – к 2,7.

Таким образом, АСМ-анализ позволил определить параметры для структурной классификации активированных пероксинитритом нейтрофилов при их взаимодействии с подложкой: параметр D/h (отношение диаметра клетки к ее высоте), размеры гранул и фрактальная размерность карт латеральных сил для областей 4×4 мкм (D_{F-4}) и 1×1 мкм (D_{F-1}).

Описанные типы нейтрофилов наблюдаются и в популяции клеток без какой-либо стимуляции, однако процент морфологически измененных клеток не велик. В случае обработки клеток пероксинитритом значительно увеличивается процент клеток 2–4 типов. При стимуляции нейтрофилов пероксинитритом уже на первых минутах взаимодействия с подложкой выявляется высокий процент клеток с диаметром больше 10 мкм (значения, характерного для 1 типа клеток). Через 1–3 ч инкубации активированных пероксинитритом клеток наблюдается бимодальное распределение клеток по диаметрам с модами: $10,9 \pm 1,1$ мкм ($11,0 \pm 0,9$ мкм; $10,1 \pm 1,4$ мкм) и $17,7 \pm 3,1$ мкм ($17,9 \pm 4,0$ мкм; $18,9 \pm 5,2$ мкм). Увеличение диаметра клетки, уменьшение объема клетки (результаты, полученные по АСМ-профилограммам, не представлены) и исчезновение малых гранул (с диаметром до 200 нм) позволили сделать вывод о том, что пероксинитрит вызывает дегрануляцию нейтрофилов, которая начинается уже в первые минуты действия пероксинитрита на клетки. В дальнейшем дегрануляция приводит к разрушению клетки, которое происходит в основном по так называемому НВЛ-пути разрушения нейтрофилов, т. е. по пути формирования нейтрофилами внеклеточных ловушек (НВЛ) [11]. Как следует из анализа литературных данных, НВЛ-путь разрушения нейтрофилов вызывается активными формами кислорода и начинается с активации НАДФН-оксидазы. Изменения морфологии нейтрофилов при активации НВЛ-пути отличаются от изменений, характерных для апоптоза и некроза. При формировании НВЛ происходит разрушение оболочки ядра клетки и смешивание ядерного содержимого с цитозолем, имеющее место до нарушения целостности плазматической мембраны. При разрыве плазматической мембраны смесь хроматина и цитозольных белков выбрасывается наружу клетки, при этом образуется внеклеточный фибриллярный матрикс, который и участвует в уничтожении микроорганизмов уже после гибели клетки. Наши результаты указывают на то, что пероксинитрит вызывает образование НВЛ. На рис. 1 и 2 представлены изображения нейтрофилов 4 типа, полученные с помощью световой микроскопии и атомно-силовой микроскопии. Видно, что ядро клетки «растворяется», заполняя все внутреннее пространство, оставшиеся гранулы группируются в отдельных областях, в то время как плазматическая мембрана еще ограничивает клетку (рис. 1, z ; рис. 2, 4 тип). Процент гибели нейтрофилов, идущей по пути формирования НВЛ (с учетом и уже разрушенных), резко увеличивается через 2–3 ч после воздействия пероксинитрита (до 48% НВЛ и 21% разрушенных по пути НВЛ против 3 и 2% в образцах без стимуляции соответственно), что является характерным для данного процесса.

Выводы. 1. На основе результатов АСМ-анализа поверхности нейтрофилов предложена структурная классификация активированных пероксинитритом нейтрофилов при их взаимодействии с подложкой и определены классификационные параметры, характеризующие форму и структуру нейтрофилов. Классификация включает четыре типа нейтрофилов, различающихся геометрическими размерами (диаметр и высота), размерами гранул на их поверхности и фрактальной размерностью карт латеральных сил для областей 4×4 мкм и 1×1 мкм. Выделенные типы нейтрофи-

лов характеризуют стадии программы клеточной гибели, которые наблюдаются при уничтожении нейтрофилами микроорганизмов.

2. Установлен новый путь активации нейтрофилов пероксинитритом, морфологически проявляющийся в их дегрануляции и в формировании НВЛ.

Литература

1. Pacher P., Beckman J. S., Liaudet L. // *Physiol. Rev.* 2007. Vol. 87. P. 315–424.
2. Carreras M. C., Pargament G. A., Catz S. D., Poderoso J. J., Boveris A. // *FEBS Lett.* 1994. Vol. 341. P. 65–68.
3. Rohn T. T., Nelson L. K., Sipes K. M., Swain S. D., Jutila K. L., Quinn M. T. // *J. Leuk. Biol.* 1999. Vol. 65. P. 59–68.
4. Zouki Ch., Zhang Sh.-L., Chan J. S. D., Filep Ja. G. // *FASEB J.* 2001. Vol. 15. P. 25–27.
5. Sato E., Simpson K. L., Grisham M. B., Koyama S., Robbins R. A. // *J Biol Chem.* 2000. Vol. 275, N 15. P. 10826–10830.
6. Kuznetsova T. G., Starodubtseva M. N., Chizhik S. A., Yegorenkov N. I. // *Micron.* 2007. Vol. 38, N 8. P. 824–833.
7. Kavalenka A. I., Semenkova G. N., Cherenkevich S. N. // *Cell and Tissue Biology.* 2007. Vol. 1, N 6. P. 551–559.
8. Robinson K. M., Beckman J. S. // *Method Enzymol.* 2005. Vol. 396. P. 207–214.
9. Starodubtseva M. N., Kuznetsova T. G., Chizhik S. A., Yegorenkov N. I. // *Micron.* 2007. Vol. 38, N 8. P. 782–786.
10. Стародубцева М. Н., Кузнецова Т. Г., Черенкевич С. Н. // *Бюл. exper. биол. мед.* 2007. Т. 143, № 2. С. 222–230.
11. Fuchs T., Abed U., Goosmann Ch., Hurwitz R., Schulze I., Wahn V., Weinrauch Y., Brinkmann V., Zychlinsky A. // *J. Cell. Biol.* 2007. Vol. 176, N 2. P. 231–241.

STARODUBTSEVA M. N., KAVALENKA A. I., CHERENKEVICH S. N.

marysta@mail.ru

STRUCTURAL DYNAMICS OF PEROXYNITRITE-ACTIVATED NEUTROPHILS

Summary

The analysis of peroxynitrite-activated neutrophils after their interaction with glass surface and chemical fixation was carried out using atomic force microscopy. The classification of peroxynitrite-activated neutrophils was put forward and the classification parameters characterizing the shape and the structure of neutrophils interacted with a substrate were determined. The neutrophil types differ in the geometrical parameters (diameter and height) as well as in the sizes of the granules on their surface and fractal dimension of lateral force maps (scanning area sizes of $4 \times 4 \mu\text{m}$ and $1 \times 1 \mu\text{m}$). A new path of neutrophil activation with peroxynitrite was revealed. It appears morphologically through degranulation and formation of neutrophil extracellular traps (NET path).