

На правах рукописи



Безруков Николай Александрович

**МОРФОМЕХАНИЧЕСКИЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ СТАТУС НЕЙТРОФИЛА В
МОДЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БАКТЕРИЕМИИ**

1.5.5 – Физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Нижний Новгород

2026

Работа выполнена в научно-исследовательской лаборатории сканирующей зондовой микроскопии научно-образовательного центра «Физика твердотельных наноструктур» и на кафедре физиологии и анатомии Института биологии и биомедицины федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского».

**Научный
руководитель:**

Плескова Светлана Николаевна – доктор биологических наук, профессор, зав. лаб. НИЛ сканирующей зондовой микроскопии ННГУ им. Н.И. Лобачевского, профессор кафедры «Нанотехнологии и биотехнологии» образовательно-научного института физико-химических технологий и материаловедения Нижегородского государственного технического университета им. Р.Е. Алексеева

**Официальные
оппоненты:**

Абакумова Татьяна Владимировна – доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры физиологии и патофизиологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ульяновский государственный университет»

Ефремов Юрий Михайлович – кандидат биологических наук, заведующий отделом современных биоматериалов Института регенеративной медицины федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

**Ведущая
организация:**


Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Дальневосточный федеральный университет»

Защита диссертации состоится 18 июня 2026 года в 15:00 часов на заседании диссертационного совета 24.2.340.06 при Национальном исследовательском Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского по адресу: 603022, г. Нижний Новгород, проспект Гагарина, д. 23, к. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского и на сайте <https://diss.unn.ru/files/2026/1628/diss-Bezrukov-1628.pdf>

Автореферат разослан «___» апреля 2026 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

 Черкасова Елена Игоревна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Трудно переоценить роль нейтрофилов в поддержании гомеостатического баланса. Они выполняют фагоцитарную функцию, напрямую уничтожая микроорганизмы; антиген-презентирующую, запуская реакции адаптивного иммунитета; регенерирующую и информационную функции, самостоятельно продуцируя и откликаясь на продукцию цитокинов, хемокинов и активных форм кислорода (Zhang et al., 2024). Последние годы ознаменовались целым рядом открытий, связанных с нейтрофилами. Выявлено, что нейтрофилы способны формировать NETs (neutrophil extracellular traps) (Brinkmann et al., 2004), которые реализуют большое количество задач от ограничения распространения микроорганизмов до участия в реакциях тромбоцитарного гемостаза и ремоделирования тканей (Zhu et al., 2025). Благодаря отказу от радиоактивных меток удалось установить, что время жизни нейтрофилов составляет не несколько часов, как это считалось раньше, а несколько суток. Открытием, имеющим большое практическое значение является обнаружение субпопуляций нейтрофилов, которые могут вести себя по-разному в реализации физиологических реакций (Плескова и др., 2009) и патологических процессов (Мягдиева и др., 2025). В прошлом году предприняты первые попытки ввести комплексные критерии для классификации всех имеющихся субпопуляций нейтрофилов (Ng et al., 2025).

Большинство эффекторных функций нейтрофилы реализуют в тканях, куда попадают в ходе диапедеза. В свою очередь состоятельность процесса трансэндотелиальной миграции во многом определяется морфофункциональным состоянием нейтрофилов, их энергетическим и ферментативным статусом, способностью к миграции, адгезии и взаимодействию с другими клетками, в первую очередь с эндотелием сосудистого русла. Процессы миграции, адгезии, переползания и диапедеза сопровождаются перестройкой цитоскелета, изменением формы клеток и модификацией поверхностных рецепторов, что в совокупности определяет их функциональную активность. Однако многие аспекты процесса, в особенности лежащие в основе трехстороннего взаимодействия нейтрофилов с эндотелием и бактериями, остаются недостаточно изученными. При этом мало внимания уделяется причинам реализации функций нейтрофила в кровяном русле, в частности, механизмам праймирования клеток, специфике их ориентационных процессов в зависимости от хемоаттрактанта, влиянию морфологии эндотелиоцитов и адгезионных контактов на активацию клеток и ее последствия. Не менее интересным является подтверждение механических преобразований клеток в процессе миграции, например, влияния пластичности ядра нейтрофила на процесс диапедеза (Qi et al., 2024). Изучение этих аспектов процесса трансэндотелиальной миграции нейтрофилов и влияние бактерий на их реализацию позволит разработать альтернативные методы регуляции миграции нейтрофилов и лучше понять причины срыва диапедеза.

Таким образом, оценка регуляции миграционной активности нейтрофилов, их морфологических, механических и функциональных перестроек при взаимодействии с эндотелием в отсутствие и в присутствии разного рода хемоаттрактантов является актуальной задачей изучения регуляции физиологических процессов миграции и диапедеза.

Цели и задачи исследования

Цель исследования – выявление морфо-функциональных изменений нейтрофилов и эндотелиоцитов и вязко-упругих характеристик их мембран в процессе трансэндотелиальной миграции и миграции вдоль сосудистого русла в модели экспериментальной бактериемии.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Разработать модели исследования миграции нейтрофилов по эндотелиальному монослою, имитирующему стенку сосуда, а также модель трансэндотелиальной миграции, позволяющие проводить наблюдения

высокоразрешающими зондовыми методами. Моделировать бактериемию в обеих системах.

2. Изучить морфо-механические особенности миграции нейтрофилов через эндотелиальный монослой и вдоль эндотелиального монослоя при наличии хемотаксического градиента, созданного бактериями и биохимическими хемоаттрактантами.

3. Определить особенности, направленность и численные характеристики миграции нейтрофилов по градиенту, созданному грамположительными (*S.aureus* 2879M, *E.faecalis* 645-p2) и грамотрицательными (*E.coli* 321, *P.mirabilis* 649-2) бактериями, а также классическими биохимическими индукторами миграции нейтрофилов: лейкотриеном B₄, фактором некроза опухоли α , липоксином A₄.

4. Оценить влияние гемодинамического процесса на характер миграции нейтрофилов по хемотаксическому градиенту, создаваемому бактериальными штаммами.

5. Количественно определить продукцию активных форм кислорода и азота в эндотелиальных клетках и нейтрофилах в момент адгезионного контакта между ними. Выявить вклад праймирования нейтрофила в продукцию активных форм кислорода (АФК) и активных форм азота (АФА) при таких контактах.

6. Выявить энергетические затраты нейтрофила при реализации миграции по хемотаксическому градиенту.

7. Сравнить морфологию, миграционную активность, продукцию АФК популяцией нейтрофилов и энергетический профиль клеток при миграции по эндотелиальному монослою и по искусственному субстрату.

Научная новизна работы. Впервые создана вертикальная и горизонтальная модель миграции нейтрофилов по градиенту хемоаттракции для исследования методом высокоразрешающей микроскопии. Впервые установлено, что основным вариантом изменения морфологии эндотелиоцитов в присутствии бактерий является уменьшение площади клеток и формирование ими фибрилл. Впервые показано, что на фибриллах эндотелиоцитов нейтрофилы могут формировать NETs. Впервые продемонстрирована морфологическая и механическая неоднородность популяции нейтрофилов при реализации трансэндотелиальной миграции. Впервые выявлено, что направленная миграция нейтрофилов обусловлена бактериальными хемоаттрактантами и характеризуется видоспецифичностью, а биохимические хемоаттрактанты способны усилить процесс. Метод высокоразрешающей микроскопии впервые позволил визуализировать феномен обратной миграции. Впервые показано, что нейтрофилы в процессе миграции образуют крупные агрегаты (в горизонтальной и проточной системах) или роение (в вертикальной модели миграции). Впервые выявлено, что такое поведение клеток, во-первых, формирует «зоны входа» для миграции нейтрофилов, во-вторых, увеличение числа праймированных нейтрофилов, взаимодействующих с эндотелиоцитами приводит к активации последних и синтезу ими АФК/АФА. Выявлен респираторный взрыв праймированных нейтрофилов при адгезионном контакте с эндотелием.

Основные положения, выносимые на защиту

1. В процессе трансэндотелиальной миграции нейтрофилы проявляют функциональную неоднородность, ассоциированную с различной миграционной активностью и с различиями в клеточной механике, определяемыми по модулю Юнга.

2. При бактериемии происходит альтерация эндотелиоцитов и нейтрофилов, которая может быть обратимой либо необратимой. В присутствии бактерий эндотелиоциты могут формировать фибриллярные отростки на которых нейтрофилы формируют NETs.

3. Для миграции нейтрофилов по градиенту, созданному бактериями, характерна видоспецифичность, которая выявляется по различиям в миграционной активности, направлению миграции, продукции активных форм кислорода или преобладании адгезионных процессов. Биохимические хемоаттрактанты самостоятельно не индуцируют

направленного движения нейтрофилов, но существенно усиливают миграционные процессы нейтрофилов под воздействием бактерий.

4. Контакты с праймированными нейтрофилами приводят к активации эндотелия, что проявляется в синтезе АФК/АФА эндотелиальными клетками. Степень активации зависит от количества связавшихся нейтрофилов и характеризуется пороговым значением. Продукции АФК/АФА эндотелиоцитами при контакте с интактными нейтрофилами не происходит.

Теоретическая и практическая значимость работы. Получены новые знания о вкладе биомеханических свойств и динамики морфо-функциональных характеристик нейтрофилов и эндотелиоцитов в процессах миграции вдоль поверхности сосудов и трансэндотелиально в модели бактериемии. Благодаря использованию методов высокоразрешающей микроскопии доказано наличие феноменов роения и обратной миграции нейтрофилов в процессе диапедеза. Теоретическая значимость продемонстрирована и в проточной системе, моделирующей кровотоки: выявлены агрегация нейтрофилов, аналогичная роению и формирование нейтрофильных «привязей». Горизонтальная модель позволила обнаружить два физиологических механизма: наличие «векторности» в миграционных процессах, инициированных бактериальными хемоаттрактантами и усиление реакции под воздействием биохимических хемоаттрактантов. Новым теоретическим знанием являются сведения об энергозатратности процесса адгезии и резко ограниченных затратах энергии в процессе миграции, который, однако, сопровождается продукцией активных форм кислорода как нейтрофилами, так и эндотелиальными клетками.

Практическая значимость работы заключается в разработке трех моделей миграции: вертикальной, горизонтальной, проточной, которые могут быть использованы для исследования методами высокоразрешающей микроскопии других физиологических (миграция стволовых клеток, обратная миграция) и патологических (сепсиса, септицемии, метастазирования) процессов. Наноамперометрический метод может быть использован для измерения уровня продукции АФК/АФА клетками и оценки степени их активации или ингибирования. Выявленные закономерности поведения нейтрофилов при трансэндотелиальной миграции могут быть использованы для разработки новых терапевтических подходов в концепции контролируемого воспаления. Основные выводы и результаты диссертационной работы будут использованы в учебном процессе в рамках курсов для студентов ННГУ им. Н.И. Лобачевского и НГТУ им. Р.Е. Алексева для студентов, обучающихся по биологическим, медицинским и инженерным специальностям.

Личный вклад автора. Автор лично участвовал в проведении всех экспериментов, обработке полученных результатов их анализе, и обсуждении, а также принимал участие в написании научных статей и апробации результатов диссертационного исследования на конференциях.

Достоверность научных результатов. Достоверность научных результатов подтверждается воспроизводимостью экспериментальных данных, использованием современных высокочувствительных методов анализа, а также согласованностью с результатами независимых исследований.

Апробация результатов. Материалы и основные результаты диссертационного исследования были представлены в форме устных докладов на международных конференциях в Китае: «IEEE International conference on manipulation, manufacturing and measurement on the nanoscale» (Чжуншань, Китай, 2024); и Республике Беларусь: «Методологические аспекты сканирующей зондовой микроскопии» (Минск, Республика Беларусь, 2025); а также на международных и всероссийских конференциях: «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Нижний Новгород, Россия, 2022, 2023, 2024, 2025); «Актуальные проблемы биомедицины» (Санкт-Петербург, Россия, 2022, 2023, 2024); форуме молодых ученых «Будущее биомедицины» (Владивосток, Россия, 2022, 2023);

молодежном форуме «Ломоносов» (Москва, Россия, 2021); и конференции «Будущее технической науки» (Нижний Новгород, Россия, 2021).

Публикация результатов исследования. По материалам диссертации опубликовано 28 печатных работ, в том числе 12 статей в научных журналах, индексируемых в базах Scopus и Web of Science, и 16 тезисов докладов на международных и всероссийских научных конференциях.

Структура и объем диссертационной работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка литературы. Текст изложен на 153 страницах и содержит 65 рисунков и 6 таблиц; список литературы включает 244 библиографических источника.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (номера проектов: 16-14-10179, 19-14-13002, 22-14-20001, 23-74-00004, 25-24-00125) и программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030» ННГУ им. Н.И. Лобачевского (номер проекта Н-486-99). Автор выражает признательность за предоставление культуры эндотелиальных клеток EA.hy 926 НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, в особенности д.б.н. Д.И. Соколову и д.м.н., профессору С.А. Селькову, за предоставление перистальтического насоса к.б.н., доц. Д.В. Новикову, а также за совместную работу сотрудникам лаборатории биофизики МИСиС, в особенности к.х.н. А.Н. Ванееву, к.ф.-м.н. В.С. Колмогорову и д.ф.-м.н. А.С. Ерофееву, сотрудникам кафедры биофизики ННГУ им. Н.И. Лобачевского, в особенности к.б.н., доц. И.В. Балалаевой и д.б.н., доц. В.А. Воденееву и сотрудникам НИЛ СЗМ ННГУ им. Н.И. Лобачевского, в особенности к.б.н., доц. Е.Н. Горшковой и Е.В. Отставновой.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нейтрофильные гранулоциты выделяли из цельной крови здоровых доноров центрифугированием на двойном градиенте фиколла-тразографа ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$; $\rho = 1,110 \text{ г/см}^3$) и двукратно отмывали стерильным физиологическим раствором (СФР). Клетки взвешивали в растворе Хенкса, забуференном 10 мМ HEPES. В эксперимент брали клетки с жизнеспособностью не менее 97%.

Эндотелиальные клетки EA.hy926 культивировали в среде DMEM-F12 (с эмбриональной телячьей сывороткой, антибиотиками, L-глутамином и ГАТ) (37 °С, 5% CO₂). В экспериментах использовали клетки 3-20 пассажей в концентрации $2,5 \times 10^5$ кл./мл.

Бактериальные штаммы (*Staphylococcus aureus* 2879M, *Escherichia coli* 321, *Enterococcus faecalis* 645-p2, *Proteus mirabilis* 649-2) выращивали на плотном скошенном ГРМ-агаре с последующей двукратной отмывкой СФР. Концентрации стандартизовали по оптической плотности.

Вертикальную модель миграции спроектировали и создали на основе модифицированной камеры Бойдена с двумя отсеками, разделенными барьером эндотелиальных клеток, которые выращивали на культуральных вкладышах (диаметр пор 3 мкм). В верхний отсек камеры вносили нейтрофилы, в нижний – один из бактериальных штаммов в концентрации MOI 10 (multiplicity of infection).

Горизонтальная модель миграции представляла собой монослой эндотелиальных клеток с перемещающимися по поверхности нейтрофилами. Градиент миграции создавали хемоаттрактантом, помещенным в контейнер с полупроницаемой мембраной. Для моделирования **проточной системы** в горизонтальную модель устанавливали вкладыш-ограничитель, позволяющий локально моделировать ток жидкости с применением перистальтического насоса Microperpex 2132-001 (Pharmacia LKB, Швеция).

Морфо-механические изменения клеток регистрировали на сканирующем ион-проводящем микроскопе (СИПМ) (ICAPPIC Ltd., Великобритания) боросиликатными нанокapиллярами с диаметром кончика 100 нм. Ионный ток регистрировали с помощью

усилителя MultiClamp 700B (Molecular Devices, США) при постоянном потенциале +200 мВ. Модуль Юнга определяли по оказываемому напряжению в диапазоне уменьшения ионного тока от 0,5 до 2% по модели Clarke и соавт. (Clarke et al., 2016).

Подсчет параметров миграции нейтрофилов проводили на серии оптических изображений из горизонтальной модели с использованием программного обеспечения Icy (Институт Пастера и France-BioImaging, Франция) и математической модели, описанной в работе Chenouard и соавт. (Chenouard et al., 2013), с применением самостоятельно подобранного профиля детекции.

Жизнеспособность клеток оценивали на проточном цитофлуориметре CytoFLEX S (Beckman Coulter International S.A., США) с их окрашиванием пропидиумом йодидом. Для определения соотношения гибели по механизмам апоптоза, некроза и NETs дополнительно проводили окрашивание Annexin V-FITC и антителами против миелопероксидазы.

Производство АФК в единичных клетках регистрировали наноамперометрическим методом с применением платинированных наноэлектродов по методике Ванеева и соавт. (Ванеев и др., 2018). Ток измеряли с помощью усилителя MultiClamp 700 В при потенциале +800 мВ. Для управления положением наноэлектрода использовали микроманипулятор PatchStar (Scientifica, Великобритания). Оценивали продукцию АФК и АФА при межклеточных контактах и под влиянием бактерий.

Производство АФК популяцией нейтрофилов при миграции определяли на микропланшетном спектрофотометре BioTekPowerWave HT (BioTek, США) после окрашивания клеток красителем АФК 6-Карбокси- H_2DCFDA .

Для измерения энергетического потенциала нейтрофила после миграции клетки фиксировали метанолом и окрашивали с помощью коммерческого набора (НПФ Абрис+, Санкт-Петербург). После окрашивания определяли средний цитохимический коэффициент, отражавший содержание гликогена в клетке.

Статистическую обработку численных результатов проводили с использованием Origin Pro 2021b (Origin Lab, США). Критерий Шапиро-Уилка использовали для определения нормальности распределения. При нормальном распределении использовали t-критерий Уэлча (t-test) и ANOVA. Если распределение отличалось от нормального, использовали U-критерий Манна-Уитни (U-test). Различия признавали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Особенности трансэндотелиальной миграции нейтрофилов по градиенту хемоаттракции, создаваемому бактериальными штаммами

В созданной вертикальной модели миграции, нейтрофилы,двигающиеся в нижнюю камеру по градиенту хемоаттракции, созданному бактериями погибали преимущественно по механизму некроза (рис. 1). После прохождения нейтрофилами эндотелиального барьера лишь малое количество клеток плотно адгезировалось на дне чашки Петри.

При регистрации трансэндотелиальной миграции нейтрофилов методом СИПМ был обнаружен характер миграции, не зависящий от используемого бактериального штамма. Нейтрофилы, приступившие к миграции, при контактах с эндотелием формировали в монослое просветы – «зоны входа», облегчая парацеллюлярную миграцию для следующих нейтрофилов, формирующих роение возле этих «зон входа» (рис. 2).

Роение нейтрофилов – слабо изученный феномен. Считается, что множество нейтрофилов образуют плотные скопления, где их эффекторные функции могут коллективно предотвращать ускользание патогенов, эффективно локализовывать и элиминировать микроорганизмы, а также способствовать заживлению ран и восстановлению тканей (Isles et al., 2021; Kienle et al., 2021; Brown and Yipp, 2023). Образование крупных зон миграции увеличивает концентрацию хемоаттрактанта, из-за чего происходит активное привлечение все новых и новых нейтрофилов к единой области

миграции. Кроме того, наличие уже доступных для миграции «зон входа» заставляет нейтрофилы перемещаться к ним за счет активного образования ламеллоподий, минуя расстояния в сотни микрометров, и мигрировать через них, не образуя новых областей миграции в непосредственной близости от себя.

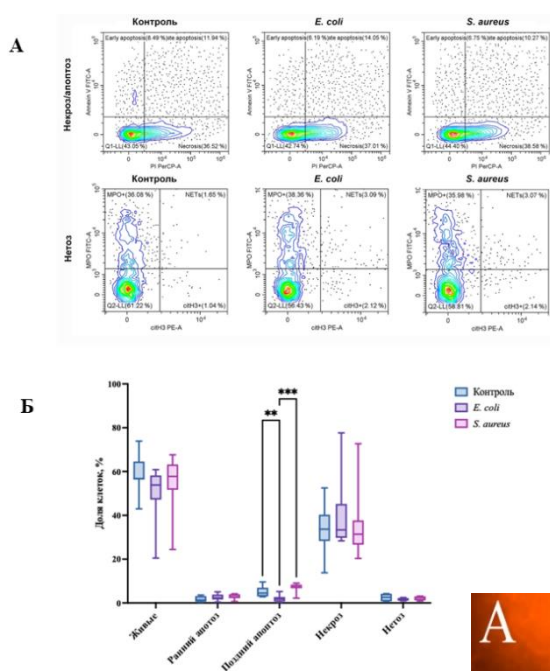
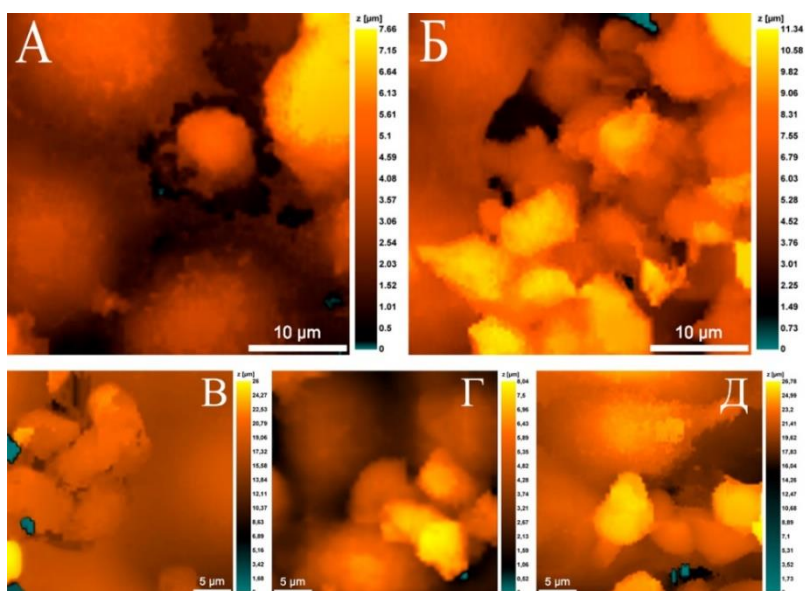


Рисунок 1 – Распределение мигрировавших в нижнюю камеру нейтрофилов по характеру клеточной гибели при моделировании очага бактериальной инфекции в нижней камере. Две трети мигрировавших нейтрофилов выживали, оставшаяся треть преимущественно погибала по механизму некроза, тенденция незначительно усиливалась в присутствии *S.aureus* и *E.coli* в нижней камере. Доля апоптоза и NETs была незначительной. (n = 5 различия статистически значимы ** – p < 0,01, *** – p < 0,001, критерий ANOVA).

Рисунок 2 – Роение нейтрофилов при миграции через эндотелиальный слой. (А) – образование «зоны входа» одним нейтрофилом при миграции по градиенту, создаваемому *S.aureus* 2879M; (Б) – роение нейтрофилов в этой области. Аналогичный процесс роения, при использовании в качестве хемоаттрактанта: (В) – *E.coli* 321, (Г) – *P.mirabilis* 649-2, (Д) – *E.faecalis* 645-p2.



Динамика морфо-механических изменений при трансэндотелиальной миграции представлена на рис. 3. Модуль Юнга эндотелиоцитов, по поверхности которых осуществлялась миграция нейтрофилов, варьировал в диапазоне от 600 до 1500 Па. Наименьшие значения модуля Юнга регистрировали на периферических участках клеток, где преимущественно и происходила парацеллюлярная миграция. Таким образом, меньший модуль Юнга на периферии эндотелиоцита, предположительно, способствует парацеллюлярной миграции нейтрофилов. Модуль Юнга нейтрофилов был значительно ниже по сравнению с интактными клетками и составлял 300-600 Па, что коррелировало с активной перестройкой цитоскелета и отсутствием плотной адгезии к субстрату. Полученные значения согласуются с данными для нейтрофилов на подложке, подвергшихся прямому воздействию штамма *S.aureus* 2879M (Pleskova et al., 2020).

Феномен функциональной гетерогенности проявлялся и при миграции. В частности, отдельные нейтрофилы не участвовали в процессе миграции, переходя в состояние анергии (рис. 4). Эти клетки обладали характерной округлой морфологией, отличной от активно

мигрирующих клеток, а также крайне низким значением модуля Юнга (порядка 200 Па). В ходе часового сканирования они локализовались в одной области, не проявляя потенциал к трансцеллюлярной миграции, которая обычно протекает в течение нескольких минут после закрепления нейтрофила в богатой ICAM-1 и кавеолином области (Lerman and Kim, 2015).

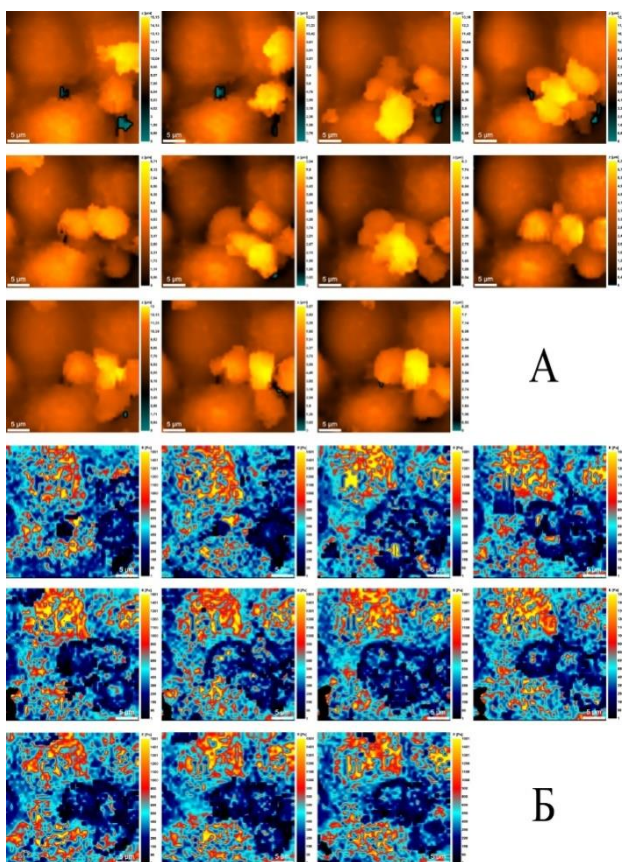


Рисунок 3 – Динамика миграции нейтрофилов через «зоны входа» в эндотелиальном слое по градиенту *P.mirabilis* 649-2. (А) – топография области. Нейтрофилы роятся для миграции через созданную предшественниками «зону входа»; (Б) – модуль Юнга исследуемой области. Мигрирующие нейтрофилы имеют сниженный модуль Юнга. Интервал между кадрами – 2 мин. Шкала от 0 до 1500 Па.

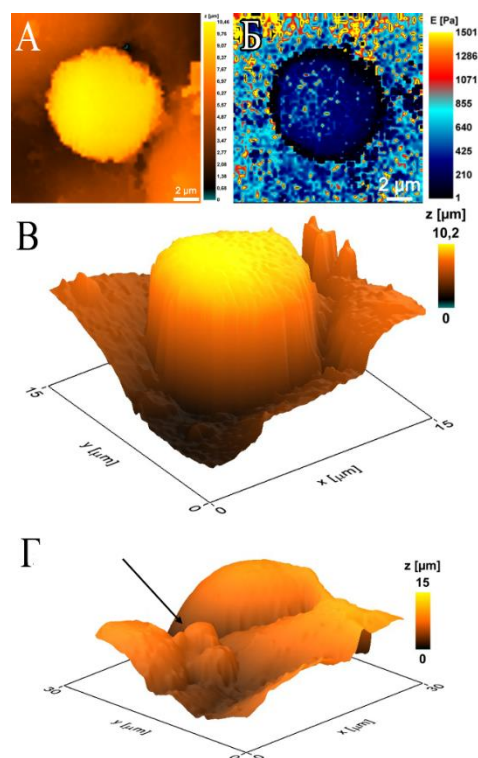


Рисунок 4 – Немигрирующие нейтрофилы в состоянии анергии. (А) – морфология покоящегося нейтрофила в системе с *E.coli* 321; (Б) – та же клетка, карта распределения модуля Юнга; (В) – та же клетка, трехмерное изображение; Г – два не мигрировавших нейтрофила (помечены стрелкой) в системе с *S.aureus* 2879M, общий план.

Кроме того, эти нейтрофилы при длительном наблюдении не подвергались наблюдаемому нами в серии других экспериментов апоптозу.

Одним из наиболее важных аспектов миграции нейтрофилов в модели являлось их взаимодействие с фибриллярными структурами эндотелиальных клеток, образующимися с течением времени (рис. 5 А-Г). Исследование характера такого взаимодействия выявило образование NETs нейтрофилом (рис. 5 Д-З). Ранее уже была показана возможность формирования NETs нейтрофилами под влиянием активированных эндотелиальных клеток (Gupta et al., 2010). Активация эндотелия в данном случае могла происходить под влиянием как бактерий, находящихся в нижней камере, так и нейтрофилов – в верхней. Однако адгезионный контакт мигрирующих нейтрофилов с фибриллярными структурами эндотелиоцитов с образованием NETs здесь показан впервые.

Таким образом, мигрирующие в модели нейтрофилы продемонстрировали большую функциональную гетерогенность. Большая часть клеток мигрировала парацеллюлярно, при этом формируя предпочтительные области миграции, где происходило роение нейтрофилов. Единичные клетки после этого мигрировали по уже проложенным маршрутам. При отсутствии таковых клетки могли переходить в анергичное состояние, не

подвергаясь диапедезу. Альтерация эндотелиального слоя же приводила к образованию фибриллярных структур и аресту нейтрофилов на них. После миграции в нижнюю камеру активированные нейтрофилы реализовывали преимущественно провоспалительные механизмы гибели даже в контрольных экспериментах.

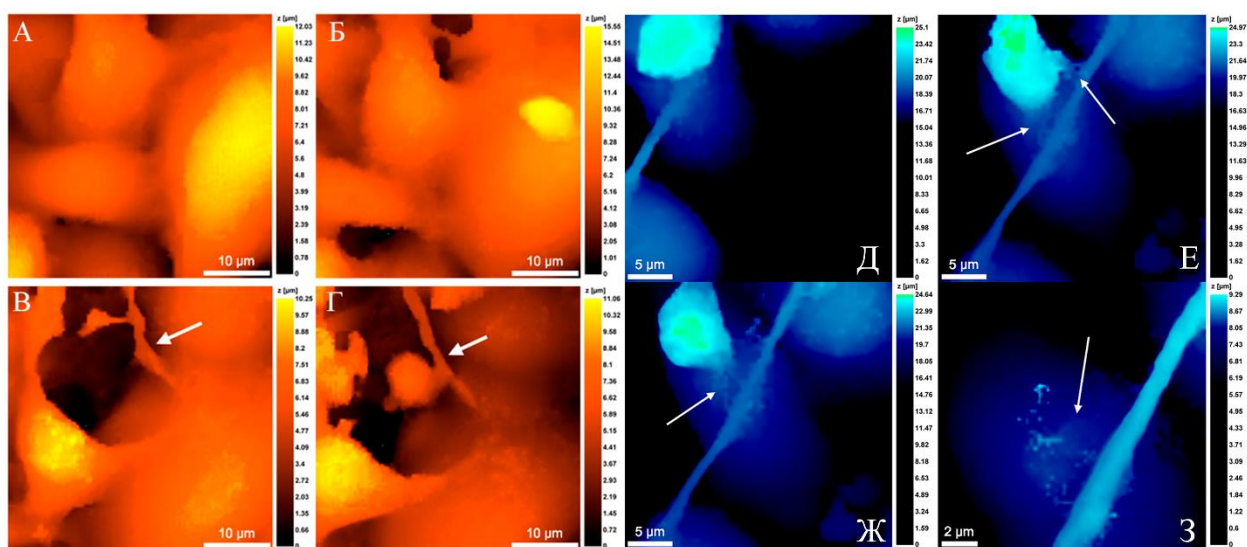


Рисунок 5 – Взаимодействие нейтрофилов с фибриллярными структурами эндотелиоцитов. (А) – интактный монослой эндотелиоцитов; (Б) – изменение структуры монослоя под воздействием бактериального хемоаттрактанта, локализованного в нижней камере по истечению 48 минут; (В) – образование фибриллярных структур через 96 минут (указаны стрелкой); (Г) – связывание нейтрофила с фибриллярной структурой; (Д) – закрепление нейтрофила на фибриллярной структуре эндотелиоцита; (Е) – попытка отделения; (Ж) – образование NETs; (3) – гибель нейтрофила. *S.aureus* 2879M использован в качестве хемоаттрактанта. Стрелками помечены NETs.

Изменения эндотелиального монослоя в процессе миграции нейтрофилов

Активация эндотелиального монослоя мигрирующими нейтрофилами и его альтерация бактериями сопровождалась серьезными морфологическими изменениями. Помимо образования фибриллярных отростков, эндотелиоциты теряли межклеточные контакты и снижали область контакта с подложкой – площадь клетки (табл. 1).

Таблица 1 – Морфометрические и вязко-упругие характеристики эндотелиальных клеток до и после миграции нейтрофилов через монослой.

| Характеристики | До миграции | После миграции |
|---|----------------|-----------------|
| Площадь проекции клетки, мкм ² | 422,3 ± 116,7 | 354,6 ± 105,2 * |
| Объем клетки, мкм ³ | 1620,8 ± 580,2 | 1697,2 ± 663,3 |
| Модуль Юнга, Па | 758,5 ± 158,1 | 711,9 ± 129,3 |

* – Различия до и после миграции статистически значимы, $p < 0,001$; t-test; $n = 20$.

Изменения могли быть как обратимыми, так и необратимыми. Например, в экспериментах со *S.aureus* было показано нарушение целостности эндотелиоцитов с последующей полной регенерацией (рис. 6 А). В то же время при длительных наблюдениях (свыше 4 часов) могла наблюдаться необратимая деградация мембраны, связанная с некротической гибелью клетки (рис. 6 Б). Критическим фактором в наблюдаемых изменениях являлся бактериальный хемоаттрактант. Штаммы *S.aureus* 2879M, *E.coli* 321, *P.mirabilis* 649-2 провоцировали деградацию монослоя. В то же время штамм *E.faecalis* 645-p2 оказывал более щадящий эффект на эндотелиоциты, которые практически не меняли морфологию в течение 6 часов с начала эксперимента.

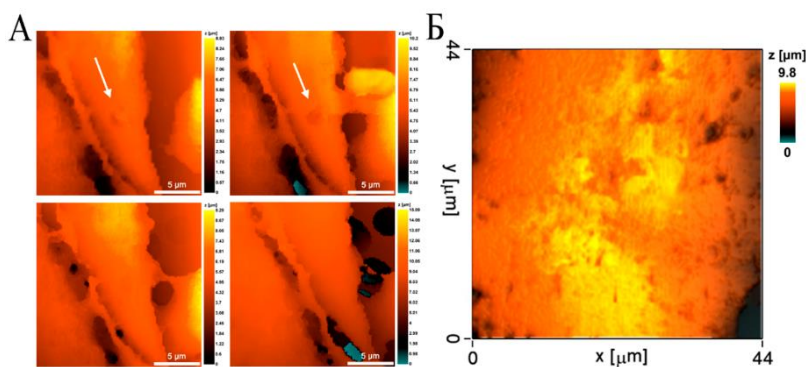


Рисунок 6 – Изменения морфологии эндотелиальных клеток в процессе миграции нейтрофилов по градиенту *S.aureus* 2879M. (А) – нарушение целостности мембраны (отмечено стрелкой) с последующей регенерацией; (Б) – поверхность эндотелиоцита спустя 4 часа после начала сканирования.

Обратная миграция нейтрофилов в вертикальной модели бактериемии

В случае гибели эндотелиальной клетки с течением времени, погибшая клетка деадгезировалась с поверхности мембраны, открывая большое количество пор. Через них мигрировавшие в нижнюю камеру нейтрофилы могли выходить обратно в верхний отсек с сохранением подвижности (рис. 7) и образованием нейтрофилом псевдоподий, помогающих перемещаться против гравитации и хемотаксического градиента.

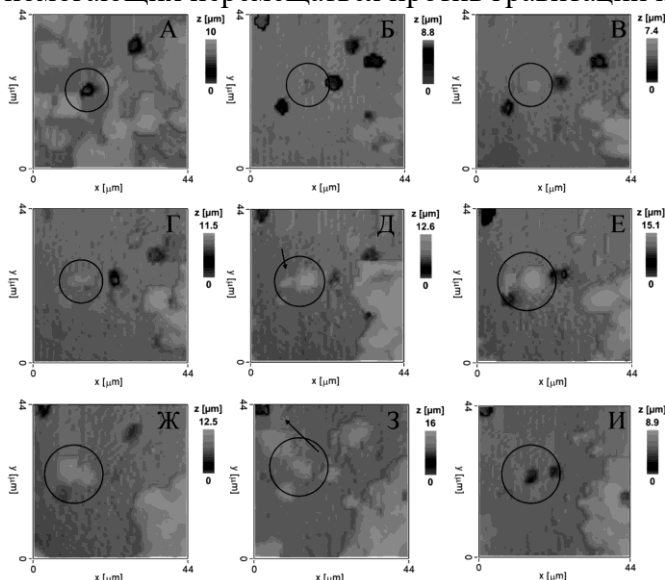


Рисунок 7 – Обратная миграция нейтрофила. (А) – изначальное поле, с внесенными нейтрофилами; (Б-Г) – пора перекрывается клеткой с обратной стороны; (Д-Е) – образование псевдоподии нейтрофилом для облегчения обратной миграции (указана стрелкой); (Ж-З) – завершение обратной миграции (стрелкой показано направление миграции); (И) – открытая сквозная пора. Интервал между кадрами 40 секунд.

Способность нейтрофила, фиксированного на мембране, осуществлять миграцию против хемотаксического градиента в верхний отсек свидетельствует об обратимости его адгезии (Filippi, 2019). Предположительно, обратно-мигрирующие нейтрофилы, выполняют преимущественно сигнальную функцию либо представляют собой выжившие клетки, покидающие очаг воспаления на завершающих этапах (Xu et al., 2022). Они способны к обратной миграции лишь из зон, непосредственно прилежащих к сосуду. В таких областях нейтрофилы могут получать молекулярные сигналы, индуцирующие обратную миграцию, от клеток, локализованных в самом очаге воспаления.

Количественные показатели миграции нейтрофилов в горизонтальной модели

Горизонтальная модель была выбрана для анализа миграционного потенциала нейтрофила, поскольку позволяла количественно определить и сравнить миграционные показатели, в качестве которых были приняты (1) процент активации нейтрофилов в процессе миграции, (2) общая пройденная дистанция, (3) смещение, отражающее направленное перемещение относительно хемоаттрактанта, (4) процент нейтрофилов, мигрирующих по направлению к хемоаттрактанту. Помимо бактериальных хемоаттрактантов были использованы классические индукторы прямой (ЛТВ4, ФНО α) и обратной (LXA4) миграции.

При проведении экспериментов на искусственных поверхностях было выявлено, что практически все нейтрофилы плотно адгезируются к поверхности и не проявляют значительной миграционной активности. В экспериментах на эндотелиальном монослое нейтрофилы свободно мигрировали по поверхности, не распластывались на монослое, и не адгезировались к нему. Напротив, клетки свободно образовывали ламеллоподии и перемещались в любом направлении. Движущиеся нейтрофилы были проанализированы в специализированной программе Icy, по результатам анализа были построены векторы миграции всех нейтрофилов в серии экспериментов для каждого из бактериальных штаммов и биохимических агентов, используемых в качестве хемоаттрактантов (рис. 8). Было показано, что направленное движение нейтрофилов по отношению к хемоаттрактанту наблюдается только при использовании бактериальных штаммов, в то время как биохимические агенты вызвали разрозненное стохастическое движение. Характер миграции также отличался в зависимости от штамма: *S.aureus* 2879M, *E.coli* 321 и *P.mirabilis* 649-2 привлекали нейтрофилы и вызывали их направленное движение к контейнеру с бактерией, в то время как *E.faecalis* 645-p2 вызывал дезориентацию нейтрофилов и их преимущественную миграцию от контейнера. Контрольный эксперимент (движение нейтрофилов при отсутствии хемоаттрактанта в камере) характеризовался стохастической миграцией нейтрофилов.

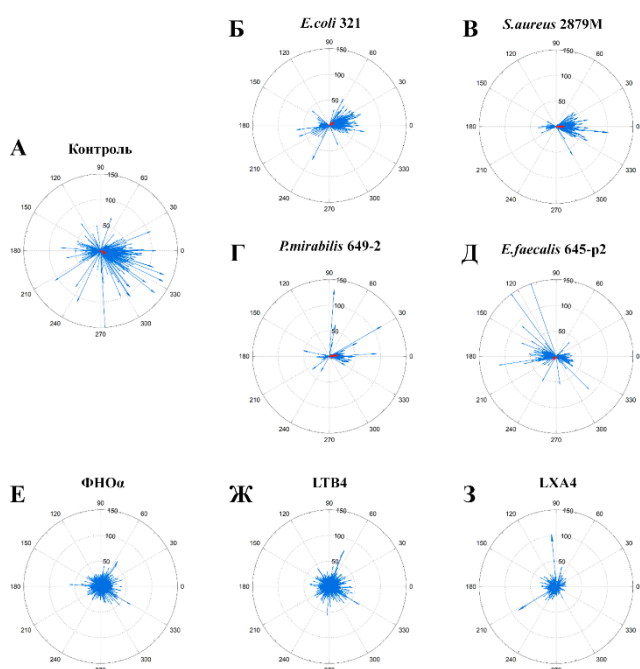


Рисунок 8 – Векторы миграции нейтрофилов в отсутствии (А) и в присутствии (Б-З) хемоаттрактанта в системе. На схеме синим цветом представлены векторы миграции высокоактивных нейтрофилов, красным – результирующий вектор миграции, нормализованный по совокупности всех мигрирующих клеток. Точкой «0» обозначена локализация контейнера с хемоаттрактантом.

При подсчете численных значений миграции статистически значимые различия среди всех бактериальных штаммов были показаны только для *P.mirabilis* 649-2 (табл. 2), при миграции в направлении которого нейтрофилы перемещались на минимальное расстояние по кратчайшему пути. Интересно отметить, что максимальное количество высокоактивных нейтрофилов регистрировалось в условиях случайной стохастической миграции в контроле, а также при использовании в качестве хемоаттрактанта *E.faecalis* 645-p2. В то же время направленная миграция характеризовалась либо незначительным (*P.mirabilis* 649-2), либо умеренным (*S.aureus* 2879M) числом высокоактивных клеток. Во всех экспериментах с бактериальными хемоаттрактантами, кроме экспериментов с *E.faecalis*, порядка 80 % процентов нейтрофилов мигрировали в сторону контейнера с бактериями.

Использование биохимических хемоаттрактантов статистически значимо сокращало общий путь миграции нейтрофилов – вероятно, за счёт активации клеток и повышения аффинности взаимодействий между нейтрофилами и эндотелиоцитами.

Поскольку адгезия под влиянием биохимических факторов могла быть признаком активации нейтрофилов, были проведены эксперименты, где использовалось одновременно два хемоаттрактанта: бактериальный штамм и биохимический агент (табл. 2). ФНОα во всех

случаях увеличивал дистанцию, пройденную нейтрофилами, при этом характер миграции становился более стохастическим. LTB4 также увеличивал пройденную дистанцию, однако в этом случае сохранялась направленность движения нейтрофилов к бактериальному хемоаттрактанту. Наконец LXA4, будучи индуктором обратной миграции, действовал двояко, увеличивая пройденное нейтрофилами расстояние по направлению к грамотрицательным бактериям и уменьшая его при миграции к грамположительным.

Таблица 2 – Основные показатели миграции нейтрофилов под влиянием исследованных хемоаттрактантов.

| Параметр | % активных клеток (больше 10 мкм смещения) | Длина пути, мкм | Перемещение, мкм | % клеток, мигрирующих к аттрактанту |
|---|--|------------------------------|---------------------------|-------------------------------------|
| Контроль | 55,86 ± 17,57 | 50,77 ± 3,46 | 20,22 ± 2,13 | Неприменимо |
| <i>E.coli</i> 321 | 45,36 ± 15,67 | 52,62 ± 7,68 | 19,86 ± 3,79 | 72,67 ± 13,18 |
| <i>P.mirabilis</i> 649-2 | 25,50 ± 8,83 | 39,25 ± 2,35 ^a | 15,71 ± 0,91 ^a | 87,24 ± 11,17 |
| <i>S.aureus</i> 2879M | 47,68 ± 10,06 | 51,20 ± 2,30 | 20,51 ± 1,87 | 83,24 ± 12,63 |
| <i>E.faecalis</i> 645-p2 | 62,43 ± 12,57 | 47,33 ± 2,47 | 19,09 ± 1,43 | 51,48 ± 30,72 |
| ФНО α | 50,05 ± 19,17 | 36,40 ± 8,19 ^a | 17,55 ± 1,84 | 50,69 ± 25,79 |
| LTB4 | 42,04 ± 12,31 | 38,83 ± 6,84 ^a | 18,25 ± 2,31 | 49,06 ± 10,33 |
| LXA4 | 45,74 ± 14,50 | 38,38 ± 8,24 ^a | 15,48 ± 1,14 ^a | 45,90 ± 37,22 |
| <i>E.coli</i> 321 + ФНО α | 59,91 ± 18,64 | 77,78 ± 15,72 ^{абв} | 20,13 ± 2,87 | 46,66 ± 20,40 |
| <i>E.coli</i> 321 + LTB4 | 51,95 ± 22,63 | 55,45 ± 15,17 | 22,17 ± 4,55 | 75,23 ± 15,76 ^б |
| <i>E.coli</i> 321 + LXA4 | 59,79 ± 25,94 | 81,27 ± 17,68 ^{аб} | 28,16 ± 14,43 | 66,62 ± 22,81 |
| <i>P.mirabilis</i> 649-2 + ФНО α | 55,59 ± 13,90 ^б | 75,79 ± 9,62 ^{абв} | 20,32 ± 2,60 ^б | 39,87 ± 21,48 ^б |
| <i>P.mirabilis</i> 649-2 + LTB4 | 61,08 ± 30,73 | 63,76 ± 9,58 ^{бв} | 18,11 ± 0,95 ^б | 35,88 ± 4,44 ^б |
| <i>P.mirabilis</i> 649-2 + LXA4 | 63,88 ± 14,25 | 65,09 ± 3,97 ^{абв} | 23,42 ± 8,54 | 56,04 ± 28,38 |
| <i>S.aureus</i> 2879M + ФНО α | 75,24 ± 22,82 | 75,05 ± 15,41 ^б | 19,89 ± 2,77 | 63,88 ± 29,28 |
| <i>S.aureus</i> 2879M + LTB4 | 70,54 ± 16,48 | 54,37 ± 4,85 ^б | 19,98 ± 2,30 | 70,27 ± 14,00 ^б |
| <i>S.aureus</i> 2879M + LXA4 | 56,92 ± 10,10 | 40,33 ± 3,05 ^{аб} | 17,42 ± 2,38 | 54,43 ± 33,78 |
| <i>E.faecalis</i> 645-p2 + ФНО α | 82,79 ± 7,77 | 91,54 ± 2,68 ^{абв} | 20,29 ± 0,76 | 31,03 ± 6,55 |
| <i>E.faecalis</i> 645-p2 + LTB4 | 57,83 ± 16,04 | 60,92 ± 6,54 ^{бв} | 21,53 ± 2,97 | 77,07 ± 1,56 ^б |
| <i>E.faecalis</i> 645-p2 + LXA4 | 44,79 ± 18,29 | 43,82 ± 4,30 | 18,02 ± 2,23 | 56,15 ± 12,03 |

^a – различия с контролем статистически значимы, $p < 0,05$;

^б – различия с бактериальным хемоаттрактантом статистически значимы, $p < 0,05$;

^в – различия с биохимическим хемоаттрактантом статистически значимы, $p < 0,05$.

Помимо миграционной активности в горизонтальной модели учитывалось образование АФК мигрирующими нейтрофилами. В контрольных экспериментах уровень продукции АФК был значительно ниже по сравнению с экспериментальными условиями, что отражает отсутствие первоначального праймирования нейтрофилов. При этом отмечалась выраженная активация эндотелиоцитов под действием фактора некроза опухоли альфа (ФНО α), что, вероятно, обусловлено его провоспалительными свойствами и способностью индуцировать повреждение клеток (Zhao et al., 2023). Кроме того, наблюдалась неравномерная «зональность» выделения АФК, что может быть связано с вторичной активацией клеток уже секретированными АФК, которые способны играть роль сигнальных молекул или вызывать неспецифическую альтерацию (Fichman et al., 2023).

В экспериментах с ФНО α , LTB4 и LXA4, где отсутствовала направленная миграция по создаваемому градиенту, регистрировалась активация нейтрофилов и продукция ими АФК. Отсутствие потенциалов к миграции при активации могло быть обусловлено недостаточной величиной градиента хемоаттрактанта для формирования направленного вектора миграции. Известно, что поляризация нейтрофилов и их миграция по градиенту LTB4 опосредуются инфламмасомой NLRP3, экспрессия которой у лейкоцитов значительно усиливается после контакта с бактериальными факторами патогенности, в частности

липополисахаридом (van Bruggen et al., 2023). В отсутствие NLRP3 поляризация не происходит, и активированные нейтрофилы либо мигрируют хаотично, либо адгезируются к эндотелию. Это также объясняет, почему в экспериментах с созданием совместного бактериально-биохимического градиента хемоаттракции миграция нейтрофилов всегда усиливалась в экспериментах с грамотрицательными *E.coli* и *P.mirabilis*.

Отсутствие направленной миграции в ответ на ФНО α в любых условиях может объясняться продукцией эндотелиальными клетками хемокина CXCL1 в ответ на стимуляцию ФНО α . CXCL1 участвует в процессе переползания нейтрофилов перед диапедезом и способствует их адгезии, но не направленной миграции (Girbl et al, 2018).

LXA4 и другие противовоспалительные медиаторы, стимулирующие обратную миграцию нейтрофилов, остаются наименее изученными. По результатам проведенных экспериментов можно предположить, что активационный эффект LXA4 связан, прежде всего, с гиперадгезивностью нейтрофилов к эндотелию – феноменом, впервые описанном в работе (Lerner et al., 1993). Это согласуется с минимальной дистанцией миграции клеток в экспериментах с LXA4 (табл. 2). Адгезия, в свою очередь, индуцирует активацию нейтрофилов, продукцию АФК, а также активных форм азота эндотелиоцитами.

Морфо-механические особенности нейтрофилов при миграции вдоль эндотелия

При использовании искусственной поверхности в экспериментах наблюдалось слабое межклеточное взаимодействие без выраженной направленной миграции: большая часть нейтрофилов была плотно иммобилизована на поверхности пластика.

Результаты исследования миграции нейтрофилов по поверхности эндотелия при использовании грамположительных (*S.aureus* 2879М) и грамотрицательных (*P.mirabilis* 649-2) бактерий в качестве хемоаттрактантов представлены на рис. 9. Зарегистрирована направленная миграция нейтрофилов вдоль эндотелиальных клеток, сопровождающаяся формированием ламеллоподий и последующим «подтягиванием» остального объема цитоплазмы. Преимущественным путём миграции служили межклеточные границы эндотелиоцитов, то есть нейтрофилы перемещались как бы по «направляющим». Кроме того, отмечались изменения морфологии эндотелиальных клеток, по которым осуществлялось движение нейтрофилов.

При этом процесс перемещения в сторону контейнера с бактериальным хемоаттрактантом сопровождался перераспределением актина к центру клетки и затем к ламеллоподии, а модуль Юнга в процессе миграции возрастал (рис. 10).

Подытоживая: в горизонтальной модели было продемонстрировано, что миграционная активность нейтрофилов и направленность общего вектора движения зависят от типа хемоаттрактанта. Так, *S.aureus* 2879М, *P.mirabilis* 649-2 и *E.coli* 321 индуцировали направленную миграцию нейтрофилов к источнику аттрактанта, тогда как *E. faecalis* 645-p2 вызывал обратную миграцию, а ФНО α , LTB4, LXA4 вызывали направленное движение исключительно в сочетании с бактериями. Без бактерий движение нейтрофилов в присутствии биохимических агентов было стохастическим. Максимальное расстояние миграции отдельных нейтрофилов наблюдалось при использовании в качестве хемоаттрактантов *S.aureus* 2879М и *P.mirabilis* 649-2.

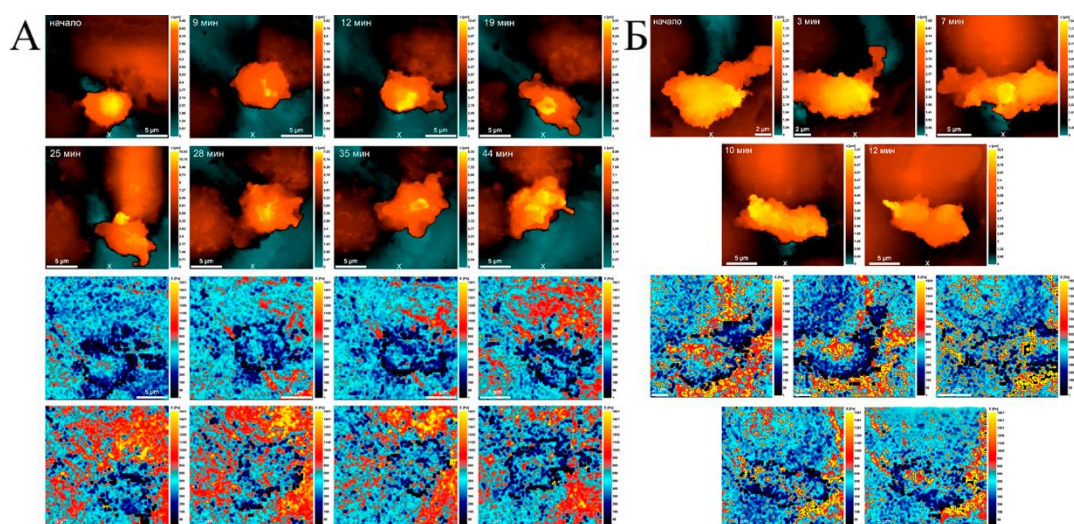


Рисунок 9 – Изменения морфологии и модуля Юнга мигрирующих нейтрофилов при перемещении по градиенту хемоаттракции, созданному (А) – *S.aureus* 2879M, (Б) – *P.mirabilis* 649-2.

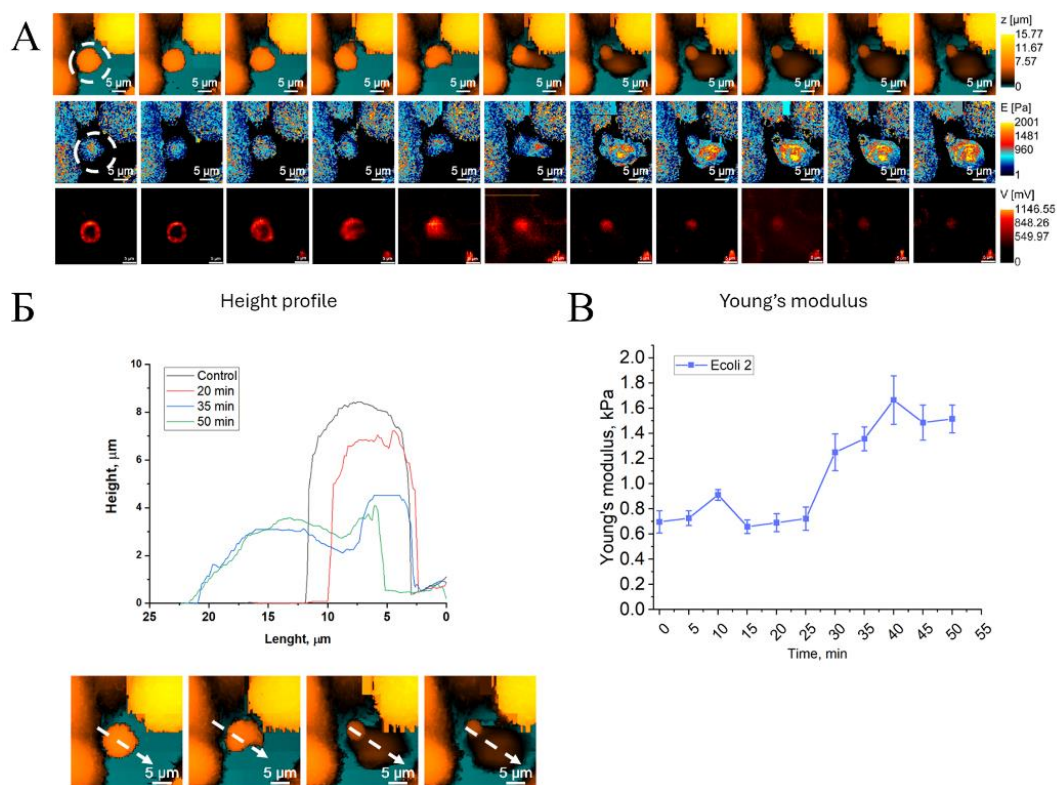


Рисунок 10 – Миграция нейтрофила при перемещении по градиенту миграции, созданному *E.coli* 321; (А) – изменение морфологии клетки, карта распределения ригидности мембраны (модуля Юнга) и распределение актина в клетке при миграции. Интервал между кадрами 5 минут; (Б) – изменение бокового профиля нейтрофила в процессе миграции; (В) – повышение модуля Юнга нейтрофила в процессе миграции.

В контрольных экспериментах и при использовании в качестве хемоаттрактанта *E.faecalis* 645-p2 регистрировались высокая подвижность нейтрофилов, в отсутствие четкой «векторности» и хаотичности движений, что проявлялось в минимальном смещении общего вектора движения (рис. 8). Вероятно, в отсутствие чёткого градиента хемоаттрактанта, нейтрофилы реализуют механизм «сканирования» пространства, аналогичный описанному Carman и соавт. для этапа диапедеза (Carman et al., 2007; Carman, 2009). Ранее также было показано, что *E.faecalis* способен вызывать срыв миграционной стратегии макрофагов

(Nunez et al., 2018). Аналогичный механизм «дезориентации» мог реализовываться и в отношении нейтрофилов, вызывая их миграцию в обратном направлении. Следует отметить, что феномен роения нейтрофилов, обнаруженный в модели вертикальной миграции, также наблюдался в горизонтальной модели.

Особенности миграции нейтрофилов при наличии гемодинамики

Поскольку все статичные модели продемонстрировали слабую способность нейтрофилов к прочной адгезии к эндотелию, для ее провоцирования, а также для моделирования динамики процесса были проведены эксперименты в проточной модели, где нейтрофилы были вынуждены «сопротивляться» току среды для миграции по направлению к хемоаттрактанту.

При моделировании направленного тока жидкости предполагалось, что основная масса нейтрофилов будет мигрировать либо по направлению потока (от источника хемоаттрактанта), либо в сторону контейнера с аттрактантом. Однако экспериментальные данные продемонстрировали, что ток жидкости со скоростью 1 мл/ч не оказывал значимого влияния на поведение клеток в системе и не ограничивал их миграцию в произвольных направлениях. Значимые изменения в характере движения клеток наблюдались лишь при двадцатикратном увеличении скорости потока, что сопровождалось выраженной агрегацией и переносом клеток током жидкости.

Интересно отметить, что максимальное количество плотно адгезированных нейтрофилов регистрировалось в контрольных экспериментах, что может быть обусловлено отсутствием их поляризации и миграционной активности. Другими группами была продемонстрирована адгезия нейтрофилов к эндотелиальным клеткам в условиях формирования потока среды (Kempers et al., 2021; Allport et al., 2022), однако в наших экспериментах гиперэкспрессии молекул адгезии (CD11a, CD11b, CD18, L-селектина, PECAM-1 и ICAM-1) не наблюдалась по сравнению со статическими моделями. На основании сопоставления наших данных с литературными можно предположить, что наличие потока активизирует адгезию, но не индуцирует клеточную поляризацию.

В экспериментах с хемоаттрактантами значительная часть клеток (1) отрывалась и переносилась потоком, (2) существенно изменяла морфологию при попытке противостоять гидродинамическому сдвигу. При этом наблюдались различные паттерны отрыва в зависимости от типа хемоаттрактанта. После 30-минутного ускорения потока жидкости более половины нейтрофилов в зоне наблюдения постепенно теряли способность противостоять току, что приводило к двукратному сокращению количества адгезированных клеток. Это может быть связано с истощением энергетических резервов клеток, уже начавших функциональную перестройку.

Другое поведение нейтрофилов наблюдалось при использовании двух бактериальных хемоаттрактантов. В случае с *P.mirabilis* 649-2 все плотно адгезировавшиеся нейтрофилы сохраняли контакт с поверхностью до конца эксперимента, что согласуется с данными статичной горизонтальной системы. При использовании в качестве хемоаттрактанта *E.faecalis* 645-p2 в статичной модели наблюдалась миграция нейтрофилов в направлении от хемоаттрактанта и в проточной системе практически все нейтрофилы теряли контакт с эндотелиоцитами и легко сносились потоком, вероятно, вследствие того же механизма дезориентации клеток под воздействием факторов патогенности бактерий.

Снова, как и в экспериментах со статичными моделями в случае миграционных процессов движение было сосредоточено в областях межклеточных контактов эндотелиоцитов. При капиллярном (1 мл/ч) токе жидкости нейтрофилы преимущественно перемещались вдоль них как вдоль направляющих (рис 11 А, Б). При миграции нейтрофилы часто образовывали агрегаты или кластеры из 2-3 клеток. В таких агрегатах наблюдались признаки межклеточной коммуникации (рис. 11 В).

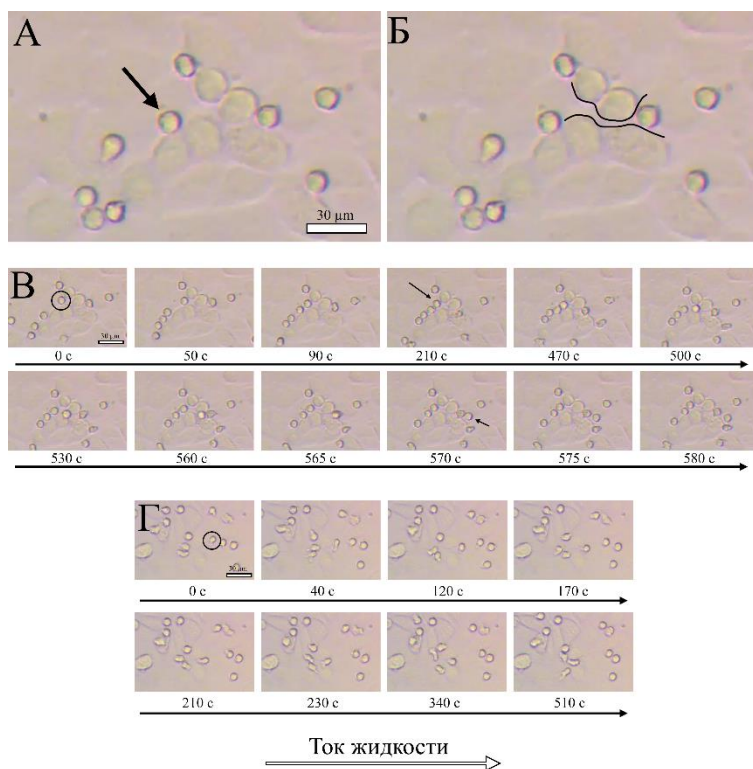


Рисунок 11 – Характер миграции нейтрофилов при токе среды 1 мл/ч: (А) – переход нейтрофилов в маргинальный пул и их миграция по направлению потока; (Б) – «направляющие» между эндотелиальными клетками; (В) – формирование нейтрофилами агрегатов при движении через сформированные направляющие; (Г) – движение нейтрофила против направления гидродинамического сдвига со скоростью тока, соответствующего капиллярному.

Введение бактериального хемоаттрактанта в контейнер существенно модифицировало коллективный характер миграции нейтрофилов. Формирование агрегатов в контрольных условиях постепенно нарастало со временем, однако не превышало аналогичное в экспериментах с бактериями. В присутствии *S.aureus* 2879М наблюдались повышенные значения агрегации нейтрофилов. Формирование агрегатов в динамической проточной системе соотносится с роением нейтрофилов и самоусилением агрегации по принципу положительной обратной связи (Lammermann et al., 2013). В литературе подобное явление в проточных моделях описано лишь однажды *in vivo* на мышинной модели: при инфицировании *Candida albicans* наблюдали формирование кластеров нейтрофилами в лёгочном микроциркуляторном русле, что приводило к обструкции микрососудов (Lee et al., 2018). Авторы считали это уникальным для грибковой инфекции, однако, по полученным нами результатам, можно предположить возможность клеточной кооперации (Yang et al., 2019) в сосудистом русле при любой интраваскулярной инфекции.

Со временем количество агрегатов в проточной системе уменьшалось, что согласуется с данными о возможном механизме их «разборки» за счёт десенсибилизации G-протеин-связанных рецепторов (GPCR) под действием LTB4 и CXCL2, секретируемых самими нейтрофилами в процессе направленной миграции (Kienle et al., 2021).

При увеличении скорости тока среды до уровня посткапиллярных венул (20 мл/ч) были зарегистрированы «нейтрофильные привязи» (Cugno et al., 2021).

Было подсчитано количество привязей, образующихся за все время эксперимента при использовании разных бактерий в качестве хемоаттрактантов (рис. 12). Внесение в систему любой бактерии увеличивало образование привязей, но только *S.aureus* 2879М и *P.mirabilis* 649-2 демонстрировали статистически значимые изменения. Эти же бактерии максимально провоцировали направленную миграцию нейтрофилов в горизонтальной модели.

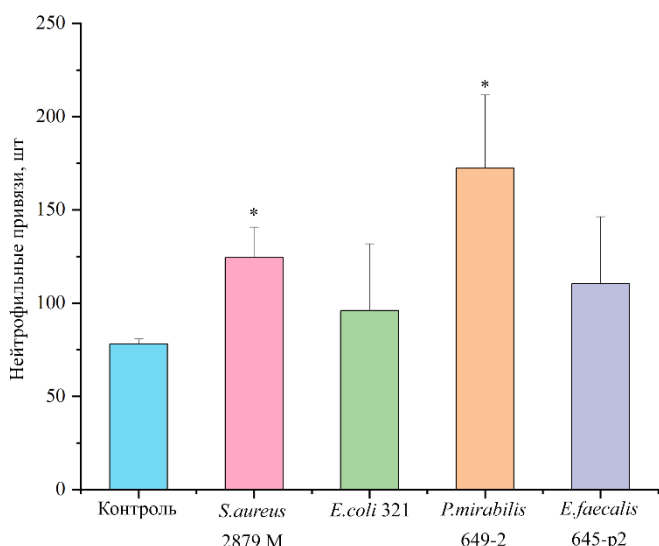


Рисунок 12 – Количество привязей, формируемых нейтрофилами в процессе миграции. * – различия с контролем статистически значимы ($n = 5$; $p < 0,05$; t-test).

Продукция АФК нейтрофилами при миграции по градиенту хемоаттракции

Поскольку была выявлена зависимость миграционных процессов нейтрофилов от используемого вида хемоаттрактанта была проведена количественная оценка продукции АФК популяцией нейтрофилов в процессе миграции.

На культуральном пластике наиболее интенсивная продукция АФК наблюдалась в контрольной группе, где отсутствовал градиент хемоаттрактанта. В экспериментах с эндотелиальным монослоем контрольная группа, напротив, демонстрировала статистически значимо более низкую продукцию АФК по сравнению со всеми экспериментальными группами (рис. 13).

Увеличение продукции АФК нейтрофилами при движении по градиенту хемоаттракции на эндотелиальном монослое по сравнению с контролем может быть связано не только с активацией клеток хемоаттрактантами, но и с межклеточными контактами активированных нейтрофилов с эндотелием. На культуральном пластике наличие хемоаттрактанта, напротив, препятствовало адгезии, снижая продукцию АФК относительно контроля и переключая клетки на промиграционный фенотип (Schwarz et al., 2024).

В исследуемой модели продукция АФК нейтрофилами нарастала в течение часа, причём этот процесс не был связан с фагоцитозом: в контрольных условиях стохастически мигрирующие клетки также продуцировали высокий уровень АФК, а бактериальные аттрактанты были изолированы мембраной. Однако нельзя исключить интернализацию низкомолекулярных бактериальных компонентов, таких как липид А. Ранее было показано, что пик продукции АФК при фагоцитозе достигается через 20-30 минут, после чего уровень постепенно снижается (Pleskova et al., 2023), тогда как в данном исследовании концентрация АФК постоянно увеличивалась в течение 60 минут.

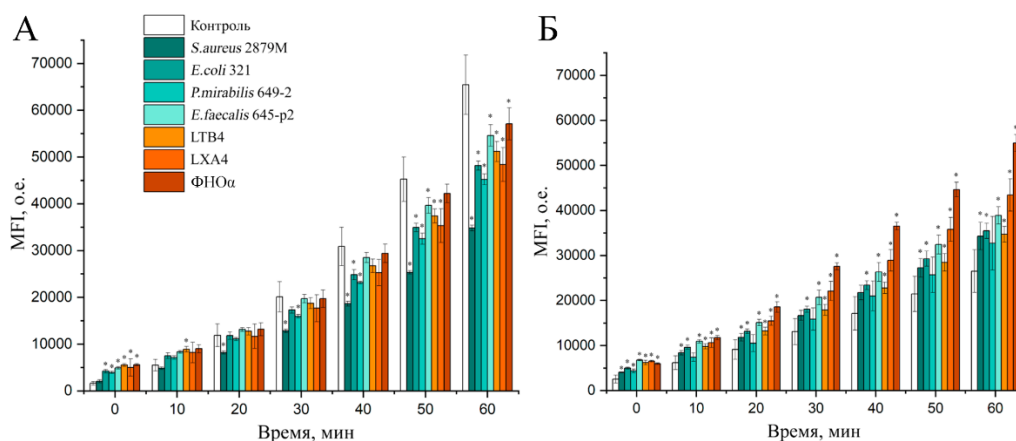


Рисунок 13 – Динамика продукции АФК нейтрофилами, мигрирующими по поверхности: (А) – культурального пластика (Б) – эндотелиального монослоя (* – различия между контрольной и экспериментальной группами статистически значимы $n = 5$; $p < 0,05$; t-test).

Оценка АФК-продукции единичными нейтрофилами как способ определения их активации при взаимодействии с бактериями

Поскольку было установлено, что нейтрофилы в процессе миграции продуцируют АФК, а наличие бактериального хемоаттрактанта вызывает продукцию АФК/АФА эндотелиальными клетками на следующем этапе был количественно определена продукция индивидуальными клетками АФК при таких взаимодействиях. Наноамперометрический метод позволяет с высокой точностью оценить продукцию АФК клеткой, в которую введен платинированный нанозонд.

Были обнаружены значительные различия в реакции нейтрофилов на стимуляцию *S.aureus* по сравнению с реакцией на *E.coli*. Пики характеризовались более выраженной амплитудой и регистрировались раньше: первые пики в ответ на *E.coli* 321 были обнаружены через $8,7 \pm 3,3$ мин, тогда как в ответ на *S.aureus* 2879М возникали через $5,4 \pm 4,6$ мин. Среднее время сверхпродукции АФК в нейтрофилах, активированных *E.coli*, составляло $9,6 \pm 3,0$ мин, а у нейтрофилов, активированных *S.aureus* 2879М – $8,4 \pm 4,2$ мин. Респираторный взрыв в нейтрофилах, активированных *S.aureus*, он был также интенсивнее (рис. 14).

Более высокая активность образования АФК в нейтрофилах в ответ на *S.aureus* 2879М по сравнению с *E.coli* 321 может быть объяснена несколькими причинами. Во-первых, *S.aureus* 2879М вызывает более выраженный нитрозативный стресс в нейтрофилах (Gupta et al., 2022). Во-вторых, механизмы первичного связывания между нейтрофилами и этими видами бактерий через Toll-like рецепторы (TLR) различны. *S.aureus* напрямую связывается с TLR-2 благодаря присутствию LTA и пептидогликанов, в то время как *E.coli* имеет более сложный механизм взаимодействия с TLR-4, включая связывающий белок и CD14. В отличие от моноцитов, нейтрофилы реже экспрессируют CD14, поэтому взаимодействие менее выражено. В-третьих, стафилококки обладают фенолрастворимыми факторами вирулентности, которые активируют рецептор человеческого формилпептида 2, что может привести к мощному респираторному взрыву нейтрофилов (Cheung et al., 2014). Таким образом, оба штамма вызывают респираторный ответ со стороны нейтрофила, но в разном объеме, что проявляется в разном уровне активации клеток.

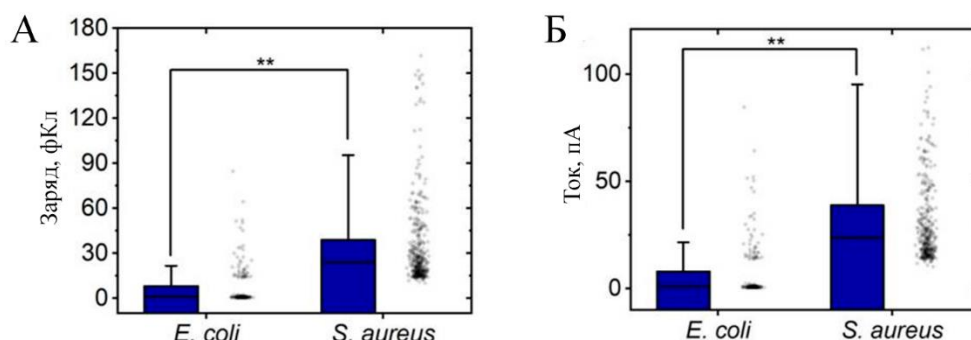
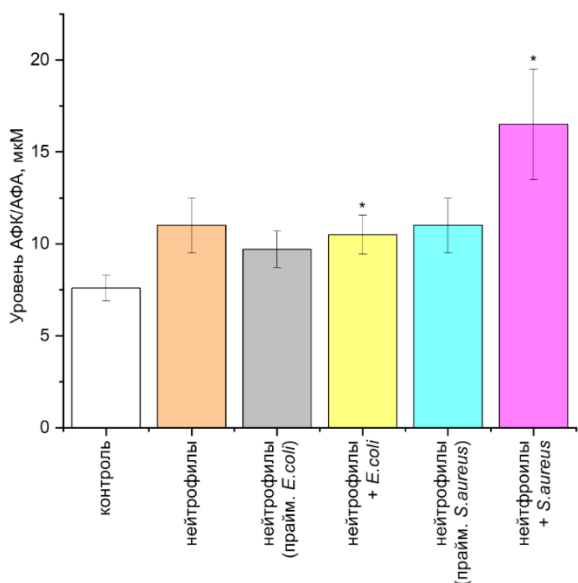


Рисунок 14 – Сравнение продукции АФК в нейтрофилах при стимуляции бактериями *E.coli* 321 и *S.aureus* 2879М. (А) – средняя площадь под кривой пика; (Б) – средняя амплитуда пика. (Количество пиков для *E.coli* (n = 166), *S.aureus* (n = 392), ** – различия статистически значимы, p < 0,001; критерий ANOVA).

Активация нейтрофилов и эндотелиоцитов при взаимодействии

Поскольку активация эндотелия отвечает за сигналинг в процессе трансэндотелиальной миграции, проводили оценку воздействия праймированных бактериями нейтрофилов на продукцию АФК/АФА эндотелиоцитами в процессе межклеточного взаимодействия, (Riddle et al., 2022). На рис. 15 представлены уровни продукции АФК/АФА эндотелиоцитом при внесении нейтрофилов и бактерий. Активация эндотелиальных клеток в присутствии нейтрофилов не регистрировалась, поскольку их спонтанное попадание в маргинальный пул и случайные контакты с эндотелием в условиях

физиологической гемодинамики не индуцируют воспалительных реакций, связанных с NO-зависимой вазодилатацией и экстравазацией.



Добавление праймированных нейтрофилов также не оказывало значимого влияния на продукцию АФК/АФА эндотелиоцитами. Однако одновременное внесение в систему бактерий и нейтрофилов вызывало статистически значимое увеличение продукции АФК/АФА эндотелиоцитами.

Рисунок 15 – Уровень продукции АФК/АФА эндотелиальными клетками линии EA.hy926 в контроле, при внесении нейтрофилов (нормальная физиологическая ситуация), при внесении нейтрофилов, праймированных *E.coli* 321 или *S.aureus* 2879M и при последовательном введении этих же бактерий и нейтрофилов (* – различия с контролем статистически значимы, $n = 20$; $p < 0,05$; t-test).

Было показано, что эндотелиоциты, контактирующие с разным количеством нейтрофилов продуцируют разное количество АФК/АФА, поэтому помимо средней продукции АФК/АФА всеми эндотелиоцитами оценили также продукцию при взаимодействии с разным количеством нейтрофилов. По результатам подсчета установили, что АФК/АФА-продукция носила накопительный характер (рис. 16), причем система достигала насыщения при среднем уровне максимальной продукции метаболитов около 15 мкМ, что можно считать пиковой продукцией АФК/АФА одним эндотелиоцитом.

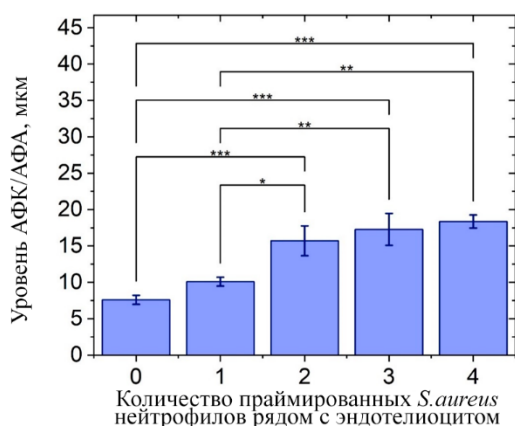


Рисунок 16 – Уровни продукции АФК в эндотелиальных клетках при контакте с различным количеством праймированных нейтрофилов (***) – $p < 0,001$; ** – $p < 0,01$; * – $p < 0,05$; критерий ANOVA).

Такая реакция эндотелия может быть объяснена адаптационным механизмом, снижающим шанс возможной активации при случайных единичных контактах. Лишь при наличии значительного количества нейтрофилов в области происходит непосредственно активация эндотелиального слоя.

Сложной задачей являлась регистрация обратного процесса – количественного определения АФК в нейтрофилах при контакте с эндотелием, поскольку для прохождения эндотелиального барьера должны быть активированы оба типа клеток (Huber et al., 1991). Для решения этой задачи мы использовали разработанную нами методику, позволяющую использовать наноманипулятор для переноса нейтрофила из одной области в другую с непрерывным измерением продукции АФК внутри клетки. В случае контакта непримированного нейтрофила с эндотелиоцитом не наблюдалось увеличения уровня тока, свидетельствующего об увеличении уровня АФК-продукции, в то время как праймированный нейтрофил при контакте с эндотелием реализовывал респираторный взрыв (рис. 17).

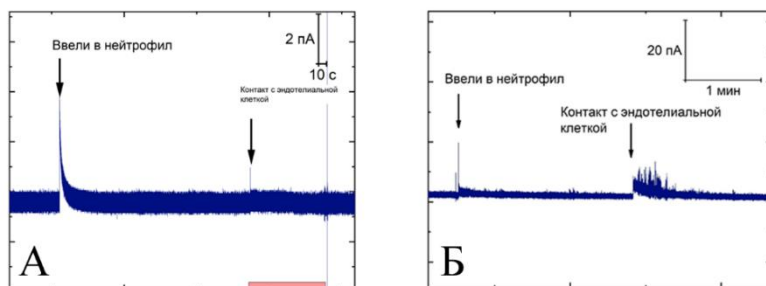


Рисунок 17 – Хроноамперограммы, полученные при взаимодействии нейтрофила с эндотелиоцитом. (А) – нейтрофил не праймирован; (Б) – нейтрофил предварительно праймирован *S.aureus* 2879M.

Предварительно праймированные нейтрофилы имели более высокий контрольный уровень продукции АФК (спайки величиной 15-30 пА). При контакте праймированного *S.aureus* 2879M нейтрофила с эндотелиальной клеткой регистрировался респираторный взрыв, наблюдаемый в течение приблизительно 30 секунд. В случае праймирования нейтрофилов грамотрицательными *E.coli* 321 наблюдали сходную реакцию, но спайки были менее выражены.

Респираторный взрыв происходил исключительно при контакте праймированных нейтрофилов с эндотелиоцитами. Этот впервые выявленный феномен, имеет важное биологическое значение: только активированный нейтрофил способен продуцировать АФК при взаимодействии с эндотелиальными клетками. В данном контексте АФК могут выполнять двойную функцию (1) сигнальной молекулы (активация эндотелия); (2) молекулы, облегчающей трансэндотелиальную миграцию за счёт ослабления межэндотелиальных контактов. При этом эффект от праймирования *S.aureus* 2879M выражен сильнее (рис. 18). Это соотносится с активацией самих нейтрофилов бактериями, где *S.aureus* 2879M вызывал более выраженную продукцию АФК при фагоцитозе. Тем не менее сходные средние уровни АФК при стимуляции обеими бактериями предполагают, что конечный оксидативный выход после контакта с эндотелием определяется общими механизмами адгезии и активации, тогда как видовая специфика бактерий вносит вклад в вариабельность ответа.

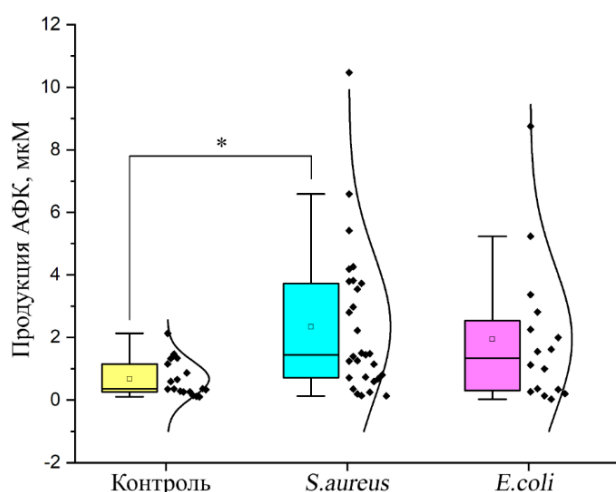


Рисунок 18 – Средний внутриклеточный уровень АФК в нейтрофилах, праймированных *S.aureus* 2879M и *E.coli* 321, после контакта с эндотелиальной клеткой (* – различия с контролем статистически значимы, $p < 0,05$; U-test).

Энергозатраты нейтрофилов в процессе миграции

На рис. 19А представлены показатели СЦК, отражающие продукцию гликогена нейтрофилами при стимуляции миграции клеток разными группами хемоаттрактантов. Показано, что нейтрофилы, мигрирующие по поверхности эндотелия вдоль хемотаксического градиента, практически не расходуют энергетические ресурсы. Вероятно, это связано с тем, что перемещение осуществляется преимущественно за счёт связывания с адгезионными молекулами эндотелия (Petri et al., 2018). Хотя рецепторная адгезия

нейтрофилов к эндотелию является АТФ-зависимым процессом (Golenkina et al., 2024), в данном случае, поскольку клетки не достигают конечной области миграции, их перемещение происходит с минимальным расходом энергии. В свою очередь на культуральном пластике вся энергия затрачивается на неспецифическую адгезию и перестройки цитоскелета.

Для проверки гипотезы о том, что нейтрофилы облегчают свою подвижность за счёт снижения адгезии и уменьшения энергетических затрат, в экспериментах на бесклеточной поверхности был проведён дополнительный подсчёт живых адгезированных нейтрофилов на чашке Петри в начале и в конце (через 60 минут) эксперимента. Полученные данные представлены на рис. 19 Б.

В контрольном эксперименте количество адгезированных нейтрофилов со временем оставалось неизменным. В экспериментах с бактериальными аттрактантами наблюдалось значительное снижение числа адгезированных клеток, особенно выраженное при использовании *S.aureus* 2879М, что указывает на активные попытки нейтрофилов к миграции. В экспериментах с биохимическими хемоаттрактантами количество адгезированных нейтрофилов не изменялось, как и в контроле, однако стоит отметить меньшее количество адгезированных клеток в экспериментах с ФНО α , что согласуется с ранее установленным меньшим расходом гликогена нейтрофилами. Аналогичные расчеты с эндотелиальным монослоем не проводились, поскольку отсутствовала плотная адгезия и распластывание.

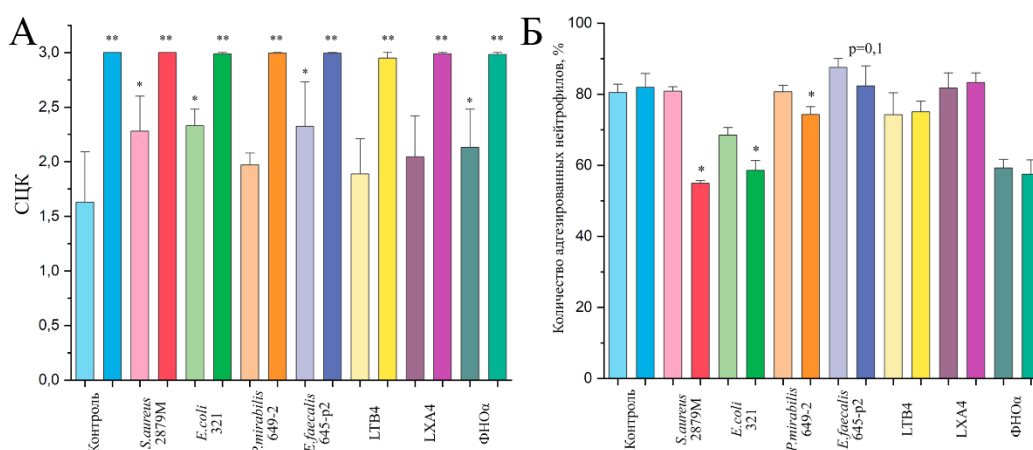


Рисунок 19 – (А) – содержание гликогена в нейтрофилах, выраженное через средний цитохимический коэффициент. Эксперименты с различными хемоаттрактантами разбиты по парам: левый столбец – эксперименты на бесклеточной поверхности, правый столбец – эксперименты на поверхности эндотелиоцитов. * – различия с контролем статистически значимы, ($n = 5$; $p < 0,05$, t-test); ** – различия с бесклеточной поверхностью статистически значимы, ($n = 5$; $p < 0,05$, U-test); (Б) – количество адгезированных нейтрофилов на бесклеточной поверхности чашки Петри под влиянием различных хемоаттрактантов на начало и конец эксперимента. Эксперименты с различными хемоаттрактантами разбиты по парам: левый столбец – начало эксперимента, правый столбец – спустя 60 минут инкубации. * – различия с началом эксперимента статистически значимы ($n = 5$; $p < 0,05$, t-test).

Среди всех экспериментов с бактериальными штаммами обнаруживались NETs, однако наибольшее количество присутствовало именно в экспериментах со *S.aureus* 2879М, что соотносится с полученными ранее результатами (Плескова и др., 2018). В то же время в экспериментах с ЛТВ4, LXA4, ФНО α NETs практически не формировались, хотя установлено, что эти хемоаттрактанты усиливают формирование NETs при воспалении (Zhou et al., 2024; Das et al., 2024; Ortega-Zapero et al., 2025). В данном случае, однако, бактерии в системе отсутствовали и хемоаттрактанты сами по себе не индуцировали NETs.

ВЫВОДЫ

1. Наличие бактерий в качестве источника хемоаттракции при трансэндотелиальной миграции нейтрофилов вызывает существенное изменение морфологии эндотелиоцитов. Формирование длинных фибрилл клетками эндотелия может провоцировать образование NETs нейтрофилами. Роение нейтрофилов при диапедезе способствует формированию обширных «зон входа» и облегчает миграцию других нейтрофилов. Впервые в высоком разрешении продемонстрирована возможность обратной миграции нейтрофила из очага воспаления в сосудистое русло.

2. Впервые продемонстрировано снижение модуля Юнга нейтрофила в процессе диапедеза через эндотелиальный монослой: от контрольных значений 500-600 Па до 300-400 Па в процессе диапедеза. При миграции по поверхности эндотелия в горизонтальной модели и использовании бактериальных хемоаттрактантов, напротив, выявлено увеличение модуля Юнга в сравнении с покоящейся клеткой от 500-600 Па в покое до 1000-1200 Па при миграции. Часть нейтрофилов в модели экспериментальной бактериемии переходят в состояние анергии и не способны к миграции: ригидность их мембрано-цитоскелетного комплекса падает до 200-300 Па.

3. Выявлена видоспецифичность миграции нейтрофилов при создании градиента хемоаттракции грамположительными (*S.aureus* 2879M и *E.faecalis* 645-p2) и грамотрицательными (*E.coli* 321 и *P.mirabilis* 649-2) бактериями. Максимальная направленность миграции нейтрофилов выявлена в присутствии *S.aureus* 2879M и *P.mirabilis* 649-2, минимальная – в присутствии *E.coli* 321, в то время как *E.faecalis* 645-p2 вызывал дезориентацию нейтрофилов. Использование *P.mirabilis* 649-2 в качестве хемоаттрактанта усиливало адгезию нейтрофилов как в статичной, так и в проточной модели.

4. В проточной модели, имитирующей хемоаттракцию в системе гидродинамического сдвига показано видоспецифичное образование «нейтрофильных привязей» (tethers), замедляющих движение нейтрофилов, а иногда и останавливающих их, с формированием прочных адгезионных контактов с эндотелиоцитами. Нейтрофилы формировали агрегаты, являющиеся аналогом роения в вертикальной модели миграции. Величина и время существования таких агрегатов зависели от скорости потока и от вида бактерий, используемых в качестве хемоаттрактанта.

5. Определено, что биохимические хемоаттрактанты LTV4, ФНО α , LXA4 самостоятельно не вызывают направленной миграции нейтрофилов, однако усиливают продукцию АФК клетками и миграционную активность нейтрофилов в присутствии бактериальных хемоаттрактантов.

6. Показана склонность нейтрофилов к миграции по границам межклеточных контактов эндотелиального монослоя. Продемонстрирована минимальная энергетическая затратность этого процесса.

7. Выявлено, что активации эндотелиоцитов, регистрируемой по продукции АФК/АФА не происходит при взаимодействии с интактными нейтрофилами. Однако контакт с праймированными нейтрофилами сопровождается активацией и гиперпродукцией АФК/АФА эндотелиоцитами, которая увеличивается статистически значимо только при контакте с несколькими нейтрофилами. Процесс достигает насыщения при пороговых значениях внутриклеточной концентрации АФК/АФА порядка 15 мкМ.

8. Детектировано, с использованием специальной «методики наноинвазивного переноса» и применением высокоточного наноамперометрического метода измерения, возникновение респираторного взрыва праймированных нейтрофилов при адгезионном контакте с эндотелием. Увеличения АФК-продукции у интактных нейтрофилов при контакте с эндотелиальными клетками не происходит.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Научные статьи в международных изданиях, входящих в международные в международные реферативные базы данных и системы цитирования Scopus и Web of Science:

1. Pleskova, S.N. *S.aureus* and *E.coli* change the force and work of adhesion between P- and E-selectins of endothelial cells and ligands of neutrophil granulocytes / S.N. Pleskova, S.Z. Bobyk, R.N. Kriukov, **N.A. Bezrukov**, E.N. Gorshkova, P.I. Vasilchikov, D.V. Novikov, V.V. Novikov // *Micron*. – 2021. – Vol. 150. – 103139 (Q1).
2. Pleskova, S.N. *Staphylococcus aureus* causes the arrest of neutrophils in the bloodstream in a septicemia model / S.N. Pleskova, S.Z. Bobyk, R.N. Kriukov, E.N. Gorshkova, **N.A. Bezrukov** // *Microorganisms*. – 2022. – Vol. 10. – №9. – 1696 (Q2).
3. Pleskova, S.N. Exploring the process of neutrophil transendothelial migration using scanning ion-conductance microscopy / S.N. Pleskova, **N.A. Bezrukov**, E.N. Gorshkova, S.Z. Bobyk, E.V. Lazarenko // *Cells*. – 2023. – Vol. 12. – №13. – 1806 (Q1).
4. Pleskova, S.N. ROS production by a single neutrophil cell and neutrophil population upon bacterial stimulation / S.N. Pleskova, A.S. Erofeev, A.N. Vaneev, P.V. Gorelkin, S.Z. Bobyk, V.S. Kolmogorov, **N.A. Bezrukov**, E.V. Lazarenko // *Biomedicines*. – 2023. – Vol. 11. – №5. – 1361 (Q1).
5. Pleskova, S.N. Differences in bacteria nanomotion profiles and neutrophil nanomotion during phagocytosis / S.N. Pleskova, E.V. Lazarenko, **N.A. Bezrukov**, S.Z. Bobyk, A.V. Boryakov, R.N. Kriukov // *Frontiers in Microbiology*. – 2023. – Vol.14. – 1113353 (Q1).
6. Pleskova, S.N. Changes in ROS/RNS levels in endothelial cells in experimental bacteremia / S. Pleskova, A. Vaneev, **N. Bezrukov**, A. Erofeev, S. Bobyk, V. Kolmogorov, P. Gorelkin, V. Mamed-Nabizade, E. Gorshkova // *ChemBioChem*. – 2024. – Vol. 25. – №18. – e202400341 (Q1).
7. Pleskova, S.N. Pathogenic *Escherichia coli* change the adhesion between neutrophils and endotheliocytes in the experimental bacteremia model / S.N. Pleskova, **N.A. Bezrukov**, S.Z. Bobyk, E.N. Gorshkova, D.V. Novikov // *Microbial Cell*. – 2024. – Vol. 11. – № 1. –P. 254-264 (Q1).
8. Pleskova, S.N. Cunning pathogen tactics: neutrophil movement influenced by bacterial attractants in the experimental model / S.N. Pleskova, **N.A. Bezrukov**, E.N. Gorshkova, E.V. Otstavnova, D.V. Novikov // *Cellular Microbiology*. – 2025. – Т. 2025. – № 1. – 8859162 (Q1).

Научные статьи в российских изданиях, входящих в международные в международные реферативные базы данных и системы цитирования Scopus и Web of Science:

9. **Bezrukov, N.A.** High-resolutions scanning ion- conductance microscopy for the study of blood cell morphology and rigidity / N.A. Bezrukov, S.N. Pleskova, S.Z. Bobyk, A.V. Boryakov // *Opera Medica et Physiologica*. – 2022. – Vol. 9. – №2. – P. 5-14 (Q4).
10. Плескова, С.Н. Исследование эндотелиальных клеток линии EA.hy926 методами атомно-силовой и сканирующей ион-проводящей микроскопии / С.Н. Плескова, **Н.А. Безруков**, Е.Н. Горшкова, С.З. Бобык, Е.В. Лазаренко // *Цитология*. – 2023. – Т. 65. – №5. – С. 437-446 (ВАК) (переводная версия: *Cell and Tissue Biology*. – 2024. – Vol. 18. – № 1. –P. 36-44 (Q4)).
11. Плескова, С.Н. Опсонизация бактерий изменяет адгезионные взаимодействия между эндотелиоцитами и нейтрофилами в модели экспериментальной септицемии / С.Н. Плескова, С.З. Бобык, **Н.А. Безруков**, Е.В. Лазаренко // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2024. – Т. 177. – № 2. – С. 215-219 (ВАК) (переводная версия: *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2024. – Vol. 177. – № 2. – P. 243-247(Q3)).
12. Плескова, С.Н. Особенности миграционных процессов нейтрофилов в проточной системе / С.Н.Плескова, **Н.А.Безруков**, Е.Н.Горшкова, Д.В. Новиков, Е.В.

Отставнова // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2025. – Т. 111. – № 7. – С. 1185-1197 (**ВАК**) (переводная версия: Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. – 2025. – Vol. 61. – № 4. – P. 1007-1015 (**Q4**)).

Тезисы докладов в зарубежных изданиях:

13. **Bezrukov, N.** Chemoattractant-dependent neutrophil migration / N. Bezrukov, S. Bobyk, E. Otstavnova, E. Gorshkova, S. Pleskova // 2024 IEEE International conference on manipulation, manufacturing and measurement on the nanoscale (3M-NANO). Zhongshan, China. – 2024. –P. 381-385.

14. Плескова, С.Н. Исследование миграции нейтрофилов в режиме реального времени методом высокоразрешающей сканирующей ион-проводящей микроскопии в модели экспериментальной септикопиемии / С.Н. Плескова, **Н.А. Безруков** // Методологические аспекты сканирующей зондовой микроскопии : XIV, Минск, 21-24 окт. 2025 г.: сб. докл. / Нац. акад. наук Беларуси, Ин-т тепло- и массообмена им. А. В. Лыкова; редкол.: С. А. Чижик (пред.) (и др.). – Минск: Беларуская навука, 2025. – С. 246-250.

Тезисы докладов в российских изданиях:

15. **Безруков, Н.А.** Трансэндотелиальная миграция нейтрофильных гранулоцитов, исследованная методом сканирующей ион-проводящей микроскопии / Н.А. Безруков, С.З. Бобык // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ- 2021» – М.: МАКС Пресс, 2021.

16. **Безруков, Н.А.** Создание аналитической двухсекционной камеры для исследования трансэндотелиальной миграции / Н.А. Безруков, С.Н. Плескова // Будущее технической науки: сборник материалов XX Всероссийской молодежной научно-технической конференции, посвященной 800-летию Нижнего Новгорода; НГТУ им. Р.Е. Алексеева. – Н. Новгород, 2021. – С. 374.

17. **Безруков, Н.А.** Сканирующая ион-проводящая микроскопия для визуализации трансэндотелиальной миграции нейтрофилов / Н.А. Безруков, С.З. Бобык // Актуальные проблемы биомедицины – 2022: материалы XXVIII Всероссийской Конф. молодых ученых с международным участием. Санкт-Петербург, 2022. – С. 169.

18. **Безруков, Н.А.** Сканирующая ион-проводящая микроскопия для визуализации нейтрофильных гранулоцитов / Н.А. Безруков, С.З. Бобык, С.Н. Плескова // Биосистемы: организация, поведение, управление. 75-я Всероссийская с международным участием школа-конференция молодых ученых. – Н. Новгород, 2022. – С.21.

19. **Безруков, Н.А.** Сканирующая ион-проводящая микроскопия для исследования морфологии и ригидности клеток крови / Н.А. Безруков, С.З. Бобык, С.Н. Плескова // Первая научно-практическая школа-конференция Института наук о жизни и биомедицины ДВФУ, Владивосток, 8-10 июня 2022 г.: материалы конференции. – Владивосток: Изд-во Дальневост. федерал. ун-та, 2022. – С. 26.

20. **Безруков, Н.А.** Картирование ригидности эндотелиальных клеток методом сканирующей ион-проводящей микроскопии / Н.А. Безруков, С.З. Бобык // Материалы XXIX всероссийской конференции Молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины». – Санкт-Петербург, 2023. – С.139.

21. **Безруков, Н.А.** Морфо-механические изменения эндотелиальных клеток линии EA.hy926 в процессе моделирования трансэндотелиальной миграции нейтрофилов *in vitro* / Н.А. Безруков, С.З. Бобык, С.Н. Плескова // Биосистемы: организация, поведение, управление: Тезисы докладов 76-й Всероссийской школы-конференции молодых ученых (Н. Новгород, 11-14 апреля 2023 г.). Н. Новгород, Университет Лобачевского, 2023. – С. 28.

22. **Безруков, Н.А.** Динамические изменения в системе «нейтрофильный гранулоцит – эндотелиоцит», исследованные методом сканирующей ион-проводящей микроскопии / Н.А. Безруков, С.З. Бобык, С.Н. Плескова // IV Форум молодых ученых «Будущее биомедицины 2023», Владивосток, 19-21 апреля 2023, – С. 12.

23. **Безруков, Н.А.** Особенности адгезии нейтрофилов при трансэндотелиальной миграции под действием бактерий / Н.А. Безруков, С.З. Бобык, Е.В. Отставнова //

Материалы XXX всероссийской конференции Молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины–2024» 21-22 марта 2024 года. – Санкт-Петербург, 2024. – С. 128.

24. **Безруков, Н.А.** *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* вызывают увеличение ригидности эндотелиальных клеток в модели бактериемии / Н.А. Безруков, С.З. Бобык, С.Н. Плескова // Биосистемы: организация, поведение, управление: Тезисы 77-й Всероссийской школы- конференции молодых ученых. Н. Новгород, Университет Лобачевского, 2024. – С. 32.

25. Отставнова, Е.В. Исследование процессов прямой и обратной миграции нейтрофильных гранулоцитов методом флуоресцентной микроскопии / Е.В. Отставнова, **Н.А. Безруков**, Е.Н. Горшкова, С.Н. Плескова // Биосистемы: организация, поведение, управление: Тезисы 77-й Всероссийской школы-конференции молодых ученых. Н. Новгород, Университет Лобачевского, 2024. – С. 267.

26. **Безруков, Н.А.** Множественные межклеточные контакты с праймированными нейтрофилами усиливают синтез активных форм азота и кислорода в эндотелиальных клетках / Н.А. Безруков, А.Н. Ванеев, С.Н. Плескова // Биосистемы: организация, поведение, управление. Тезисы 78-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых. Н. Новгород, 2025. – С. 36.

27. Отставнова, Е.В. Динамическая проточная система для исследования миграции нейтрофилов / Е.В. Отставнова, **Н.А. Безруков**, Е.Н. Горшкова, С.Н. Плескова // Биосистемы: организация, поведение, управление. Тезисы 78-й Всероссийской с международным участием школы-конф. молодых ученых. Н. Новгород, 2025. – С. 194.

28. Щукина, Д.Р. Активированные эндотелиальные клетки меняют характер миграции нейтрофилов / Д.Р. Щукина, **Н.А. Безруков**, С.Н. Плескова // Биосистемы: организация, поведение, управление. Тезисы 78-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых. Н. Новгород, 2025. – С. 289.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

АФА – Активные Формы Азота

АФК – Активные Формы Кислорода

ГАТ – Гипоксантин, Аминоптерин, Тимидин

ГРМ-агар – агар Гидролизата Рыбной Муки

СИПМ – Сканирующая Ион-Проводящая Микроскопия

СФР – Стерильный Физиологический Раствор

СЦК – Средний Цитохимический Коэффициент

ФНО α – Фактор Некроза Опухоли α

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

EA.hy926 – гибридная клеточная линия человека, полученная путем слияния эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC) с клетками аденокарциномы легкого (A549)

GPCR-рецепторы – G-protein-coupled Receptors

ICAM 1 – Inter-Cellular Adhesion Molecule 1, CD54

LTB4 – Лейкотриен B4

LXA4 – Липоксин A4

MOI – Multiplicity of Infection

NETs – Neutrophil Extracellular Traps

PECAM-1 – Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule 1

TLR – Toll-like Receptor

HEPES – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоная кислота, цвиттер-ионный органический буферный агент