

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ НИЖЕГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ ИМ. Н. И. ЛОБАЧЕВСКОГО»

*На правах рукописи*



БЕЗРУКОВ НИКОЛАЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ

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

1.5.5 – Физиология человека и животных

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

С.Н. Плескова

Нижний Новгород – 2026

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	8
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1 Нейтрофилы .....	15
1.2 Привлечение нейтрофилов в очаг воспаления .....	16
1.3 Трансэндотелиальная миграция нейтрофилов.....	21
1.4 Хемотаксис нейтрофила в процессе миграции.....	25
1.5 Фагоцитоз .....	31
1.6 Механизмы гибели нейтрофила в очаге инфекции .....	33
1.7 Обратная миграция нейтрофилов .....	36
1.8 Нейтрофилы и заболевания человека .....	38
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	42
2.1 Материалы исследования.....	42
2.2 Методы исследования .....	42
2.2.1 Выделение нейтрофилов .....	42
2.2.2 Культивирование эндотелиальных клеток EA.hy926.....	43
2.2.3 Приготовление бактериальных суспензий.....	44
2.2.4 Подбор среды исследования.....	44
2.2.5 Создание миграционных моделей .....	46
2.2.5.1 Вертикальная модель трансэндотелиальной миграции нейтрофилов .....	46
2.2.5.2 Горизонтальная модель миграции нейтрофилов по градиенту хемоаттракции .....	50
2.2.5.3 Проточная модель миграции нейтрофилов.....	51
2.2.6 Эксперименты по определению активных форм кислорода и азота в клетках .....	52
2.2.6.1 Подготовка и калибровка зондов.....	53
2.2.6.2 Определение продукции АФК в нейтрофилах при стимуляции бактериальными штаммами.....	54

2.2.6.3	Определение активных форм кислорода и азота в эндотелиальных клетках при взаимодействии с бактериальными штаммами и нейтрофилами.....	54
2.2.6.4	Определение продукции АФК нейтрофилами в момент адгезионного взаимодействия с эндотелиальным монослоем .....	56
2.2.7	Определение продукции активных форм кислорода популяцией нейтрофилов.....	57
2.2.8	Определение энергетического потенциала мигрирующих нейтрофилах по содержанию гликогена в клетке .....	57
2.2.9	Статистический анализ .....	58
3.	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....	59
3.1	Характер трансэндотелиальной миграции нейтрофилов в вертикальной модели .....	59
3.1.1	Особенности миграции нейтрофилов через эндотелиальный монослой в вертикальной модели исследования трансэндотелиальной миграции .....	59
3.1.2	Характер трансэндотелиальной миграции нейтрофилов, исследованный высокоразрешающим методом СИПМ .....	62
3.1.3	Изменения эндотелиального монослоя в процессе миграции нейтрофилов.....	72
3.1.4	Обратная миграция нейтрофилов .....	74
3.1.5	Исследование нейтрофилов после миграции в нижнюю камеру методом СИПМ.....	76
3.2	Характер трансэндотелиальной миграции нейтрофилов в горизонтальной модели .....	77
3.2.1	Количественные показатели миграции нейтрофилов в горизонтальной модели трансэндотелиальной миграции .....	77
3.2.2	Исследование миграции нейтрофилов в горизонтальной модели методом СИПМ.....	85
3.3	Особенности миграции нейтрофилов в проточной системе миграции.....	97
3.4	Определение биологических аналитов в клетках наноамперометрическим методом для выявления их активации .....	105
3.4.1	Определение АФК в единичных нейтрофилах для измерения их активации при взаимодействии с бактериями.....	105

3.4.2 Активация нейтрофилов и эндотелиального слоя при взаимодействии между собой .....	109
3.5 Популяционная активность продукции АФК нейтрофилами при миграции .....	115
3.6 Энергетика нейтрофилов в миграционном процессе.....	118
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	124
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ .....	128

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

<b>АФА</b>	Активные формы азота
<b>АФК</b>	Активные формы кислорода
<b>АЦП-ЦАП</b>	Аналого-цифровой преобразователь – цифро-аналоговый преобразователь
<b>ГАТ</b>	Гипоксантин, аминоптерин, тимидин
<b>ГРМ-агар</b>	агар Гидролизата рыбной муки
<b>ГТФ</b>	Гуанозинтрифосфат
<b>ММП</b>	Матриксная металлопротеиназа
<b>МПО</b>	Миелопероксидаза
<b>НЭ</b>	Нейтрофильная эластаза
<b>ПЭТГ</b>	Полиэтиленгликольтерефталат
<b>РХ</b>	Раствор Хенкса
<b>СИПМ</b>	Сканирующая ион-проводящая микроскопия
<b>СОД</b>	Супероксиддисмутаза
<b>СФР</b>	Стерильный физиологический раствор
<b>СЦК</b>	Средний цитохимический коэффициент
<b>ФНО<math>\alpha</math></b>	Фактор некроза опухоли $\alpha$
<b>ФСБ</b>	Фосфатно-солевой буфер
<b>ANOVA</b>	Analysis of variance
<b>BLT-1</b>	Leukotriene B4 receptor 1
<b>CLR</b>	C-type lectin receptors
<b>CR</b>	Complement receptors
<b>CXCL</b>	CXC хемокиновые лиганды
<b>CXCR</b>	CXC хемокиновые рецепторы
<b>DAMP</b>	Damage-associated molecular patterns
<b>DMEM</b>	Dulbecco's modified Eagle medium

<b>EA.hy926</b>	Гибридная клеточная линия человека, полученная путем слияния эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC) с клетками аденокарциномы легкого (A549)
<b>ENDS</b>	Elongated neutrophil-derived structures
<b>ESL-1</b>	E-selectin ligand-1
<b>FcγR</b>	Fcγ-рецептор
<b>GPCR</b>	G-protein-coupled receptors
<b>HEPES</b>	4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазин этансульфоновая кислота
<b>ICAM-1</b>	Inter-cellular adhesion molecule 1
<b>iNOS</b>	inducible Nitric oxide synthase
<b>JAM-C</b>	Junctional adhesion molecule-C
<b>LFA-1</b>	Lymphocyte function-associated antigen 1
<b>LM</b>	Ламинин
<b>LTB4</b>	Лейкотриен B4
<b>LXA4</b>	Липоксин A4
<b>Mac-1</b>	Macrophage-1 antigen
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinase
<b>MFI</b>	Mean fluorescence intensity
<b>MOI</b>	Multiplicity of infection
<b>NETs</b>	Neutrophil extracellular traps
<b>NLR</b>	Nod-подобные рецепторы
<b>NOX2</b>	Никотинамидадениндинуклеотидфосфат -оксидаза 2
<b>PAMP</b>	Pathogen-associated molecular patterns
<b>PECAM-1</b>	Platelet endothelial cell adhesion molecule-1
<b>PI</b>	Йодистый пропиций
<b>PI3K</b>	Phosphoinositide 3-kinase
<b>PRR</b>	Pattern recognition receptors

<b>PSGL1</b>	P-selectin glycoprotein ligand-1
<b>PtNE</b>	Платиновый наноэлектрод
<b>TLR</b>	Toll-подобные рецепторы

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

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, реползания 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 В<sub>4</sub>, фактором некроза опухоли  $\alpha$ , липоксином А<sub>4</sub>.

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 присутствие 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 синтезе 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, определяемым по модулю Юнга.

2. При бактериемии происходит альтерация эндотелиоцитов и нейтрофилов, которая может быть обратимой либо необратимой. В присутствие 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 (сепсис, септицемия, метастазирование) 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. Алексеева 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.

### **Структура и объем диссертационной работы**

Диссертация состоит из списка сокращений и обозначений, 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.

## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Нейтрофилы

Нейтрофилы – эффекторные клетки системы неспецифической резистентности, основная линия защиты от внеклеточных патогенов и регулятор процесса острого воспаления [Маянский и Маянский, 1989; McCracken and Allen; Carnevale et al., 2023]. Современное представление о нейтрофильных гранулоцитах обогатилось знанием об их значительной функциональной и фенотипической гетерогенности и гораздо более сложным участием в регуляции гомеостатического баланса организма. Однако при проявлении гиперреактивности клеток они способны вызывать альтерацию органов, аутоиммунные реакции и воздействовать на микроструктуру опухолей [Liew and Kubes, 2019; Lehman and Segal, 2020]. Нейтрофилы являются неотъемлемой частью регуляции иммунных реакций, опосредованных через разнообразный набор рецепторов клеточной поверхности [Futosi et al., 2013]. Toll-подобные рецепторы (TLR) распознают микробные структуры для предотвращения инвазии патогена [Zhang et al., 2021], а низкоаффинные рецепторы Fc $\gamma$  (Fc $\gamma$ R) и лектиновые рецепторы С-типа (CLR) играют ключевую роль в активации адаптивного иммунного ответа [Fetz et al., 2021]. Сопряженные с G-белком рецепторы (GPCR – *G-protein-coupled receptors*) – рецепторные тирозинкиназы и молекулы адгезии, такие как селектины и интегрины, участвуют в реализации функциональной активности нейтрофилов: от регуляции респираторного взрыва, до участия в трансэндотелиальной миграции [Bouti et al., 2020; Dahlgren et al., 2024]. Связывание рецепторов нейтрофилов с лигандом активируют множественные нисходящие пути передачи сигнала, которые регулируют факторы транскрипции через каскады фосфорилирования, опосредующие функции нейтрофилов в процессе их жизнедеятельности [Rajaratnam et al., 2019].

Одним из основных проявлений функциональной активности нейтрофилов является инфильтрация тканей. Она критически важна для элиминации патогенов и восстановления тканей и должна строго контролироваться, поскольку аномальное накопление нейтрофилов в тканях ведет к развитию неконтролируемого воспаления и альтерации тканей и органов [Fattori et al., 2016; Takizava et al., 2022; Maureen et al., 2024].

Привлечение нейтрофилов в ткани (экстравазация) представляет собой сложный многоступенчатый процесс, регулируемый взаимодействием клеточных и молекулярных механизмов. На начальном этапе нейтрофилы адгезируются к эндотелию сосудов под влиянием провоспалительных цитокинов и бактериальных пептидов. Этот процесс опосредуется экспрессией и активацией адгезионных молекул на эндотелии. Первичные контакты обеспечиваются лейкоцитарными селектинами, что приводит к слабой и транзиторной адгезии, активирующей роллинг (прокат) нейтрофилов по поверхности эндотелия. Далее, под действием хемокинов, эндотелия, происходит активация лейкоцитарных интегринов, что обеспечивает прочную адгезию и арест нейтрофилов на эндотелии. После стабилизации контакта клетки претерпевают морфологические изменения: уплощаются, поляризуются и начинают мигрировать вдоль эндотелиальной поверхности в поиске оптимального участка для диапедеза в ткани. На финальном этапе нейтрофилам необходимо преодолеть перицитарный слой и базальную мембрану венул, чтобы достичь воспаленных интерстициальных тканей [Muller, 2016].

## **1.2 Привлечение нейтрофилов в очаг воспаления**

Мобилизация нейтрофилов в очаг воспаления инициируется модификациями поверхности эндотелия, индуцированными провоспалительными медиаторами, секретируемыми резидентными лейкоцитами [Osaka et al., 2016]. Быстродействующие образ-распознающие рецепторы (PRR – *pattern recognition receptors*) системы неспецифической

резистентности напрямую активируют эндотелиальные клетки и усиливают экспрессию молекул адгезии [Patin et al., 2019]. Во время взаимодействия с патогеном PRR обнаруживают консервативные структуры бактерий – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMP – *pathogen-associated molecular patterns*), и распознают молекулярные паттерны поврежденных клеток хозяина – молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением (DAMP – *damage-associated molecular patterns*) [Li and Wu, 2021]. К основным PRR относятся мембраносвязанные рецепторы TLR и CLR, сканирующие внеклеточную среду и эндосомальные компартменты, цитоплазматические рецепторы, чувствительные к нуклеиновым кислотам (ДНК-сенсоры, такие как AIM2 (*absent in melanoma 2*), или РНК-сенсоры, такие как RIG-I (*retinoic acid-inducible gene 1*) и белок 5, ассоциированный с дифференцировкой меланомы (MDA5)), а также Nod-подобные рецепторы (NLR – *Nod-like receptor*) [Thomas and Schroder, 2013]. Наличие широкого спектра рецепторов позволяет точно адаптировать иммунный ответ не только к типу патогена (грамположительные и грамотрицательные бактерии, простейшие, вирусы и грибы), но и к уровню угрозы, которую патоген представляет для реагирующей клетки, что определяется локализацией зоны распознавания патогена (в цитоплазме, внутренних компартментах или вне клетки). Например, такой патоген, как сальмонелла, при внеклеточном обнаружении запускает TLR-зависимую продукцию провоспалительных цитокинов и фагоцитарные антимикробные пути нейтрофилов, тогда как обнаружение того же патогена внутри клетки запускает NLR-зависимую гибель клетки [Broz et al., 2012].

Привлечение нейтрофилов в очаг инфекции происходит преимущественно в посткапиллярных микрососудах микроциркуляторного русла, хотя может находиться и в артериолах при воспалительных процессах [Cha et al., 2022]. В норме нейтрофилы свободно перемещаются в кровотоке, экспрессируя на своей поверхности L-селектин – трансмембранный гликопротеин I типа [Ivetic, 2018]. Экспрессия L-селектина нейтрофилами может быть нарушена из-за хронического воспаления, что срывает способность нейтрофила к миграции на

самой ранней стадии. Также L-селектин может не экспрессироваться на незрелых или напротив, слишком старых нейтрофилах [Кашутин и др., 2018]. Связывание L-селектина с лигандами, экспрессируемыми на поверхности эндотелия (GlyCAM-1, CD34, MadCAM-1), запускает первичное связывание и роллинг нейтрофилов, что является начальным шагом в многоступенчатом каскаде адгезии [Ivetic et al., 2019]. Процесс роллинга разделен на быстрый и медленный. Быстрый роллинг в основном зависит от P-селектина. Быстро экспрессирующийся P-селектин, предварительно накапливающийся в тельцах Вайбеля-Паладе эндотелия, обеспечивает рекрутирование циркулирующих нейтрофилов и способствует их устойчивой адгезии к эндотелиальной поверхности сосудов посредством взаимодействия с гликопротеиновым лигандом 1 P-селектина (PSGL1 – *P-selectin glycoprotein ligand-1*) нейтрофила. При этом PSGL-1 плотно прикреплен к актиновому цитоскелету нейтрофила и облегчает динамическую полимеризацию актина, необходимую для медленного роллинга [Snapp et al., 2002]. Захваченные нейтрофилы продолжают свой роллинг по поверхности эндотелия по направлению кровотока [Ridger et al., 2002]. E-селектин экспрессируется эндотелием относительно медленно, связывается с гликопротеином нейтрофилов ESL-1 (*E-selectin ligand-1*) и опосредует медленный роллинг нейтрофила, попутно активируя экспрессию интегринов [Kuwano et al., 2010; Chase et al., 2012; Carpenberg et al., 2022]. Также E-селектин напрямую связывается с экспрессируемым нейтрофилами L-селектином [Ivetic, 2018]. Большая часть L-селектина сбрасывается нейтрофилом в процессе роллинга [Ivetic et al., 2019], в том числе из-за того, что его наличие на поверхности клетки влияет на эффективность уничтожения патогена: расщепление L-селектина усиливает опосредованную интегрином внеклеточную сигнализацию, что приводит к усилению эффекторных функций нейтрофилов [Carpenberg et al., 2019]. Однако недавние исследования показали, что L-селектин может оставаться на клеточной мембране и влиять на процесс трансэндотелиальной миграции: образовывать со-кластеры с адгезионной молекулой PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule-1*), блокируя

сигнальные пути PECAM-1 и отщепление самого L-селектина, и за счет этого снижать скорость трансэндотелиальной миграции нейтрофилов. Такая кластеризация происходит специфически в клетках эндотелиального монослоя, активированных фактором некроза опухоли (ФНО), но не IL-1 $\beta$  [Rahman et al., 2021].

Если роллинг нейтрофила происходит в быстром кровотоке, требуются стремительное образование и разрушение адгезионных контактов с эндотелиальными клетками. При диссоциации на заднем крае клетки связи P-селектин-PSGL1 должно происходить образование новой связи на переднем [Khismatullin and Truskey, 2012]. Нейтрофилы образуют небольшие мембранные структуры, называемые «привязями» («*tethers*») [Cugno et al., 2021] сзади и «стропами» («*slings*») [Sundd et al., 2012] спереди, что увеличивает площадь связывания мембраны с поверхностью эндотелия. На эти мембранные структуры приходится бóльшая площадь адгезии между нейтрофилом и эндотелиоцитом [Rocheleau et al., 2015]. Мембранные «привязи» и «стропы» характеризуются высокой экспрессией PSGL-1 и наличием интегрина LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen 1*), которые выступают ключевым адгезионным компонентом, способствующим роллингу нейтрофилов даже при высоких скоростях сдвига кровотока [Sundd et al., 2012; Marki et al., 2018]. Первоначально «привязь» образует временный участок фиксации благодаря связыванию PSGL-1 с P-селектином. По мере роллинга «привязь» разрывается, и PSGL1 постепенно отделяется от своего лиганда. Впоследствии «привязь» поворачивается вперёд, действуя как «стропа». Длина таких «привязей» может варьировать от 16 до 22 мкм [Marki et al., 2016]. В отличие от других исследованных клеток, способных образовывать «привязи» (это клетки глиобластомы, астроциты, макрофаги, фибробласты [Pontes et al., 2011; Pontes et al., 2013; Nussenzeig, 2018]) наличие актина в «привязях» нейтрофилов до сих пор не было показано [Cugno et al., 2021]. Вероятно, за счет этого «привязи» нейтрофилов могут обрываться, оставляя ENDS (*elongated neutrophil-derived structures*) – бактерицидные мембранные структуры, богатые лактоферрином, миелопероксидазой (МПО),

альбумином, глицер-альдегид-3-фосфат дегидрогеназой, каталазой и  $\alpha$ -энолазой, [Marki et al., 2016]. Обрыв таких структур происходит в утончающихся «слабых» местах с высокой концентрацией тангенциального напряжения [Alimohamadi et al., 2024]. Роллинг с образованием мембранных структур происходит пока нейтрофил не достигнет области адгезии.

Процесс роллинга и постепенное замедление движения нейтрофилов облегчают связывание мембранных хемокиновых рецепторов с лигандами эндотелиальных клеток, что в свою очередь индуцирует активацию интегринов [Pruenster et al., 2015; Capucetti et al., 2020]. Интегрины могут иметь три различные конформации: низкоаффинную изогнутую, расширенную «закрытую» ( $E^+$ ) с промежуточной аффинностью и расширенную «открытую» ( $H^+$ ), с высокой аффинностью к лиганду [Fan et al., 2016; Kolasangiani et al., 2022]. Модель переключения конформаций включает две последовательные стадии перехода от закрытой структуры к удлиненной  $E^+$ , и далее к перестройке сайта связывания лиганда для увеличения аффинности в конформации  $H^+$  [Luo et al., 2007]. Эти конформационные переходы интегринов могут индуцироваться и стабилизироваться внутриклеточными сигнальными каскадами или взаимодействиями со специфическими внеклеточными лигандами, например, фибронектином [Bouti et al., 2020]. Активация внутриклеточной сигнализации запускает изменение сродства интегрин к его лиганду, известное как активация интегрин изнутри наружу, что, в конечном итоге, приводит к объединению киндлина и талина с хвостом  $\beta 2$ -интегрин. Киндлин и талин – ключевые адгезионные белки, которые инициируют сборку адгезионных комплексов, обеспечивающих стабильное закрепление интегринов на актиновом цитоскелете, а также создание сигнальных центров, регулирующих клеточные процессы [Sun et al., 2019, Aretz et al., 2023]. Взаимодействие в первую очередь происходит через хвостовую часть LFA-1, состоящего из двух субъединиц, обозначенных как альфа-субъединица (CD11a) и бета-субъединица (CD18), с последней и происходит связь киндлина и талина [Thome et al., 2018]. Аналогичным образом идет взаимодействие через интегрин Mac-1 (*Macrophage-1 antigen*; CD11b/CD18)

[Silva et al., 2020]. Нейтрофилы экспрессируют высокие уровни интегринов Mac-1 и LFA-1 постоянно. Активация позволяет им связываться с наиболее распространенными адгезионными молекулами эндотелия: межклеточной молекулой адгезии 1 (ICAM-1 – *intercellular adhesion molecule 1*) и межклеточной молекулой адгезии 2 (ICAM-2) [Li et al., 2018]. ICAM-1 при этом служит биосенсором для передачи сигналов «снаружи внутрь» [Verma and Kelleher, 2019; Vui et al., 2020]. Сродство между LFA-1 и ICAM-1 также модулируется  $\text{Ca}^{2+}$ , который усиливает взаимодействие за счет изменения конформации LFA-1 [Schaff, 2008]. В покоящихся нейтрофилах концентрация цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  остаётся низкой, но быстро повышается после стимуляции, либо за счёт высвобождения  $\text{Ca}^{2+}$  из внутренних депо, либо за счёт притока внеклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  [Bagur and Najnóczy, 2017]. Рецепторное связывание вызывает плотный арест нейтрофилов, приводящий к их накоплению на поверхности эндотелия. Схематично процесс перехода нейтрофила в маргинальный пул и его адгезии на сосудистом эндотелии с обозначением основных рецепторов представлен на рисунке 1.

### **1.3 Трансэндотелиальная миграция нейтрофилов**

После адгезии нейтрофилы начинают более медленное движение вдоль эндотелия, известное как «переползание», которое в отличие от роллинга может происходить как по направлению кровотока, так и против него [Harding et al., 2014]. При переползании активно происходит «зондирование» поверхности: нейтрофилы удлиняют и вытягивают псевдоподии, исследуя свое окружение, но при этом оставаясь закрепленными в одном месте внутри сосудистой системы [Rocheleau et al., 2016]. В процессе переползания нейтрофилы стремятся достичь контактов между эндотелиальными клетками для облегчения своей миграции [Filippi, 2019].

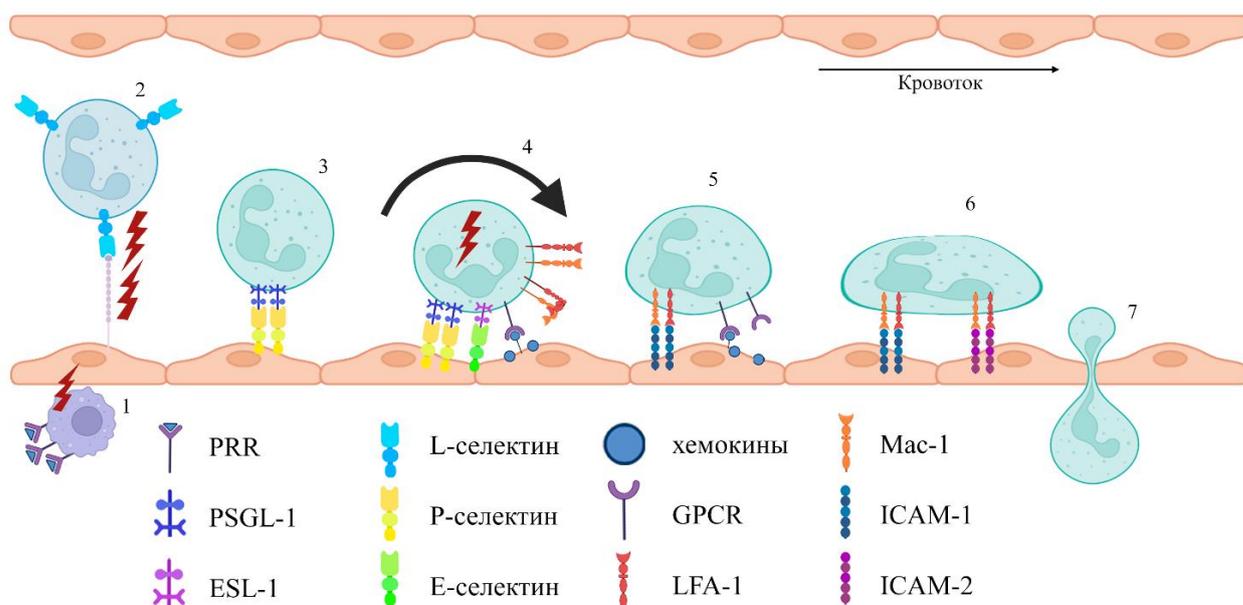


Рисунок 1 – Принципиальная схема трансэндотелиальной миграции нейтрофилов с участием основных молекул адгезии. (1) Резидентные макрофаги активируются за счет распознавания DAMP/PAMP посредством PRR и воздействуют на эндотелий, экспрессирующий лиганды L-селектина; (2) L-селектин нейтрофила неплотно связывается с лигандами эндотелия и переходит в маргинальный пул. L-селектин сбрасывается нейтрофилом; (3) P-селектин высвобождается из телец Вайбеля-Паладе эндотелия, связываясь с PSGL-1 нейтрофилов и опосредуя их быстрый роллинг; (4) роллинг замедляется за счет дополнительных связей E-селектина с ESL-1. Нейтрофилом экспрессируются хемокиновые рецепторы, рецепторы LFA-1 и Mac-1; (5) LFA-1 и Mac-1 нейтрофила связываются с ICAM-1 эндотелия, тормозя нейтрофил. Нейтрофил продолжает перемещаться по хемокиновому градиенту; (6) происходит плотный арест нейтрофила за счет связи LFA-1 и Mac-1 с ICAM-1 и ICAM-2. Клетка распластывается на поверхности эндотелия; (7) Происходит диапедез.

Переползание зависит от прохождения этапов активации-инактивации интегринов и динамики перестроек актинового цитоскелета [Yolland et al., 2019; Margraf et al., 2020]. Экспрессируемый эндотелиоцитами ICAM-1 взаимодействует с Mac-1 для регуляции [Buffone et al., 2019], а актин-связывающие белки, например, актин-связывающий белок-1 млекопитающих (MABP-1 – *mammalian actin-binding protein 1*), могут выступать линкерами между актином и  $\beta 2$ -интегрином, увеличивая их сродство [Schymeinsky et al., 2011]. Другой значимый компонент, участвующий в переползании – это VAV-1, необходимый для переползания перпендикулярно и против тока. VAV-1 вызывает

активацию Mac-1, с последующим плотным связыванием с LFA-1 [Phillipson et al., 2009; Pantarelli and Welch, 2018]. Таким образом в процессе роллинга и переползания нейтрофилы плотно адгезируются к эндотелию и находят подходящие места для миграции в поврежденные ткани. В зависимости от прочности адгезии нейтрофила могут изменяться морфологические и механические характеристики клетки [Francois et al., 2017].

Для достижения очага инфекции или воспаления нейтрофилам необходимо последовательно преодолеть несколько структурных барьеров: эндотелиальный слой сосудов, базальную мембрану и перицитарный слой, локализованный под эндотелием. Основным путем экстравазации – парацеллюлярный диапедез, осуществляющийся на границах контактов эндотелиальных клеток. Парацеллюлярный диапедез зависит от PECAM-1, действующего как механический сенсор [Mickael et al., 2021]. Альтернативный путь, трансцеллюлярная миграция прямо через эндотелиальные клетки, требует образования «трансмиграционной чаши» – микроворсинчатого выроста, который образуется вокруг нейтрофила и, в конечном итоге, обволакивает его куполообразной структурой [Filippi, 2019]. Такие выросты богаты ICAM-1 [Carman and Springer, 2004]. Формирование подобного купола зависит от связывания F-актина, который экспрессируется в ядре и цитоплазме покоящихся эндотелиальных клеток и прикрепляется к цитоскелету во время активации эндотелия [Hossain et al., 2015]. Важным условием трансцеллюлярной миграции является наличие в области caveолина-1 (CAV-1) [Carman and Springer, 2008]. Трансцеллюлярный путь активируется в первую очередь при невозможности или затруднении реализации парацеллюлярного. Было показано, что у PECAM<sup>-/-</sup> мышей увеличивается количество нейтрофилов, мигрирующих трансцеллюлярно [Wimmer et al., 2019]. В то же время нейтрофилы мышей без CAV-1 мигрируют практически исключительно парацеллюлярно [Lutz et al., 2017]. Интересно, что миграция нейтрофилов периферической крови через эндотелиальные клетки может повышать экспрессию ICAM-1 на самих нейтрофилах. Предполагается, что PAMP и/или цитокины, наряду с

трансэндотелиальной миграцией, также усиливают экспрессию ICAM-1 нейтрофилов в местах воспаления [Vignarajah et al., 2024]. Базальную мембрану нейтрофилы пересекают за счет высвобождения протеиназ, в первую очередь коллагенолитических матриксных металлопротеиназ (ММП), высвобождающихся из желатиназных гранул [Bradley et al., 2012]. В процессе прохождения через мембрану нейтрофилы могут дополнительно активироваться присутствующими в ней белками ламининами (LM), в частности, показано, что LM 111, 211, 332, 411, 421, и 511 стимулировали образование NETs [Silva-Oliveira et al., 2022].

После преодоления базальной мембраны нейтрофилы взаимодействуют с перицитами через ICAM-1-зависимые взаимодействия, образуя расширения, которые соединяются с выступами перицитов, в конечном итоге выискивая щели, чтобы попасть в ткани [Joulia et al., 2022]. В последние годы роль перицитов была значительно пересмотрена. В ответ на воспалительные сигналы они значительно усиливают трансмиграцию нейтрофилов через эндотелиальный барьер, не увеличивая проницаемость для малых молекул. При этом активация такой реакции достигается не прямой бактериальной стимуляцией, а, как и в случае с клеточным эндотелием, воздействием макрофагов. Активация цитокинами макрофагов приводит к экспрессии перицитами хемокинов CCL2 и CXCL8 [Gil et al., 2022], которые связываются с хемокиновыми рецепторами нейтрофилов.

Прорвав базальную мембрану и попав в мезенхиму, нейтрофилы претерпевают существенную клеточную деформацию, связанную с полимеризацией актина и реорганизацией окружающих тканевых структур [Lerchenberger et al., 2013; Salvermoser et al., 2018].

Необходимо отметить, что количество продуцируемых эндотелием молекул адгезии на всех стадиях, начиная с селектинов при запуске роллинга и заканчивая ICAM при диапедезе, влияет на развитие хронического воспалительного процесса. Высокие уровни E/L-селектина, ICAM-1 и ICAM-2 коррелируют с тяжестью хронического воспаления [Рашина и Чурносков, 2022].

При успешной противовоспалительной терапии уровни селектинов, напротив, снижаются [Peterson et al., 2024].

#### **1.4 Хемотаксис нейтрофила в процессе миграции**

Каскад миграции нейтрофилов представляет собой высокоорганизованный процесс, координируемый хемоаттрактантами и их специфическими рецепторами. Эти молекулы опосредуют градиент-зависимую направленную миграцию нейтрофилов – хемотаксис – посредством последовательной трансдукции сигналов. Локальные градиенты концентрации хемоаттрактантов определяют вектор интраваскулярной локомоции нейтрофилов, направляя их к очагу инфекции или воспаления [Azhar et al., 2021]. Хемотаксис включает три взаимосвязанных процесса: периодическое удлинение псевдоподий, поляризацию клетки для увеличения чувствительности передней части, и ориентационное восприятие, отвечающее за сравнение хемотаксического градиента с внешним [van Haastert and Devreotes, 2004]. Поддержание формы клетки и сохранение клеточной архитектоники зависит от организации актиновых микрофиламентов [Pollard and Cooper, 2009]. Образование псевдоподий во многом зависит от динамической реорганизации микрофиламентов. Инициация сборки актиновых филаментов (нуклеация) является лимитирующей стадией процесса, точная регуляция которого осуществляется комплексом актин-родственных белков 2/3 (Arp2/3) [Daly et al., 2022]. В отсутствие хемотаксических сигналов микрофиламенты цитоскелета формируют псевдоподии в случайных направлениях. Псевдоподии существуют около 60 с, после чего либо втягиваются обратно, либо прикрепляется к субстрату, облегчая поступательное движение тела клетки. При наличии в ткани градиента хемоаттракции возрастает вероятность образования псевдоподий на стороне наибольшей концентрации хемоаттрактанта, а формирование боковых псевдоподий подавляется [Alonso et al., 2025].

Миграция и поляризация нейтрофилов связаны с радикальной перестройкой тубулинового цитоскелета, включающей полимеризацию актина. В общем случае среди фаз движения клеток выделяют протрузию, адгезию, перемещение, открепление и подтягивание. Однако нейтрофилы реализуют амебоидный тип подвижности, где фазы не отчетливы и слиты в единое скользящее движение. Процесс заключается в выдвигании переднего участка клеточной мембран (протрузии или псевдоподии). Формирование таких структур обусловлено локальной полимеризацией актина и сопровождается образованием специализированных мембранных выростов: ламеллоподий, филоподий и мелких мембранных выростов. Далее протрузия закрепляется на поверхности эндотелия, клетка перемещается вперед за счет сокращения миозина, а затем открепляет и подтягивает уropодию [Воротников, 2011]. Направление движение в данном случае определяется поляризацией нейтрофила.

Вся регуляция поляризации нейтрофила основана на связывании хемоаттрактантов с хемокиновыми рецепторами [Michael and Vermeren, 2019]. Экспрессия хемокиновых рецепторов нейтрофилами ограничена группой CXС [Carucetti et al., 2020]. CXCR2 и CXCR4 являются основными рецепторами для CXCL8 и CXCL12 соответственно. Экспрессируемый в том числе перицитами CXCL8 также может связываться с CXCR1. CXCR2 является основным хемокиновым рецептором, экспрессируемым нейтрофилами [Korbecki et al., 2022; Lazennec et al., 2024]. Рецепторы CXCR1 и CXCR2 оба участвуют в активации нейтрофилов, но их функции в контексте воспаления и инфекции различаются. Исследования на нокаутных мышах подчеркнули критическую роль CXCR2 в развитии воспалительных заболеваний, сопровождающихся инфильтрацией и активацией нейтрофилов [de Oliveira et al., 2018]. Несмотря на то, что мыши с дефицитом CXCR2 выглядят в целом здоровыми, у них наблюдаются дефекты ангиогенеза и заживления ран, повышенная восприимчивость к патогенным инфекциям и сниженный клиренс возбудителей, что обусловлено нарушением рекрутирования нейтрофилов в очаг инфекции [Nagarkar et al., 2009; Delobel et al., 2022]. Роль CXCR1 в противомикробной

защите была продемонстрирована у людей, имеющих вариант гена CXCR1, который коррелировал с повышенной восприимчивостью к бактериальным инфекциям. Нейтрофилы этих пациентов проявляли спонтанную дегрануляцию и снижение фунгицидной активности [Dominguez et al., 2019]. Экспрессия CXCR2 в нейтрофилах зависит от стадии заболевания и повышается при воспалении. Напротив, у пациентов с различными иммуноопосредованными заболеваниями наблюдается снижение уровня CXCR2 [Zhang et al., 2019], например, у пациентов с нарушенной работой печени, ассоциированной с вирусом гепатита В [Xu et al., 2016]. У нейтрофилов пациентов с сепсисом наблюдалось снижение уровня CXCR2 и ингибирование CXCL8-индуцированных миграционных ответов [Bruserud et al., 2023]. Помимо направления миграции нейтрофилов к очагам воспаления, сигнальный путь CXCR2 способствует их высвобождению из костного мозга, противодействуя задержке, опосредованной CXCR4 в костном мозге [Eash et al., 2010]. Хемокиновые рецепторы также лежат в основе противоопухолевого иммунитета, поскольку многие опухолевые клетки, например при немелкоклеточном раке легкого, экспрессируют значительные количества CXCL8, реакция CXCR1/2 с которыми провоцирует высвобождение цитотоксических молекул (АФК, протеолитических ферментов) и образование NETs [Таганович и др., 2019]. В то же время, в некоторых случаях, хемокины (например, CXCL12 через связывание с CXCR4) способствуют подавлению активности нейтрофилов, их перепрограммированию в «проопухолевый» фенотип (N2-нейтрофилы), которые подавляют Т-клетки и способствуют ангиогенезу [Мягдиева и др., 2024].

Сопряжение CXCR2 с G-белком инициирует активацию внутриклеточных сигнальных путей, опосредующих различные биологические эффекты. Так, путь PLC/PKC влияет на функцию клеток, MAPK/p38 и Ras/ERK способствуют пролиферации и выживанию клеток, а JAK2/STAT3 участвует в миграции и клеточном делении LFA-1 и Mac-1 инициируют сборку адгезионных комплексов [Cheng et al., 2019]. Особую роль играет путь PI3K/Akt, который индуцирует миграцию клеток. PI3K выступает ключевым внутриклеточным сигнальным

медиатором, расположенным ниже оси CXCR2/CXCL8 в сигнальном пути PI3K/Akt, а фосфорилирование Akt, опосредуемое CXCR2 стимулирует хемотаксис нейтрофилов [Montano-Rendon et al., 2021]. Мыши с дефицитом CXCR2 демонстрируют сниженную восприимчивость к спонтанному развитию опухолей, таких как меланома, рак предстательной железы и рак почки [Jamieson et al., 2012; Ha et al., 2017].

Поляризованная клетка способна к направленному движению. Динамическая полимеризация актина и сокращение миозина регулируется белками, активируемыми сигнальной трансдукцией [Wille et al., 2018]. Филаменты миозина II, которые преимущественно присутствуют в дорсальном и латеральном кортикальном слоях клеток, обеспечивают ретракцию уropодии и подавляют образование латеральных псевдоподий [Tsai et al., 2019]. При этом путь RhoA/ROCK/миозин II ограничивает способность рецепторных сигналов передавать сигнал ГТФазы Cdc42, которая в свою очередь контролирует полярность нейтрофилов через свой эффектор WASp, контролируя его активацию и отдаленную локализацию на уropодии, где он регулирует реорганизацию интегрина CD11b в устойчивые к детергентам мембранные домены. CD11b в свою очередь рекрутирует белок, связывающий концы микротрубочек для стабилизации [Kumar et al., 2012]. Фосфорилирование легкой цепи миозина способно переориентировать мигрирующие нейтрофилы, модулируя активность и локализацию миозина II [Hadjitheodorou et al., 2021]. Вместе полимеризация актина и образование псевдоподии на переднем крае клетки, а также импульс к ретракции, обеспечиваемый миозином на заднем крае, обеспечивают миграцию нейтрофилов по хемотаксическому градиенту.

Однако формирование стабильных поляризованных адгезионных контактов с субстратом через специализированные рецепторы не всегда является обязательным условием для миграции нейтрофилов, особенно если движение происходит в трехмерном внеклеточном матриксе. В таких условиях клетки используют протрузии, заполняя ими поры и зазоры в матриксе. После фиксации протрузий цитоплазма перетягивается на передний край и подтягивает тело

клетки. На нейтрофилах и других амебоидных лейкоцитах показано, что одни и те же клетки способны адаптивно переключаться между интегрин-зависимым и интегрин-независимым механизмом перемещения с учетом наличия рецепторов и характера окружения [Воротников, 2011]. Принципиальная схема передвижения нейтрофилов приведена на рисунке 2.

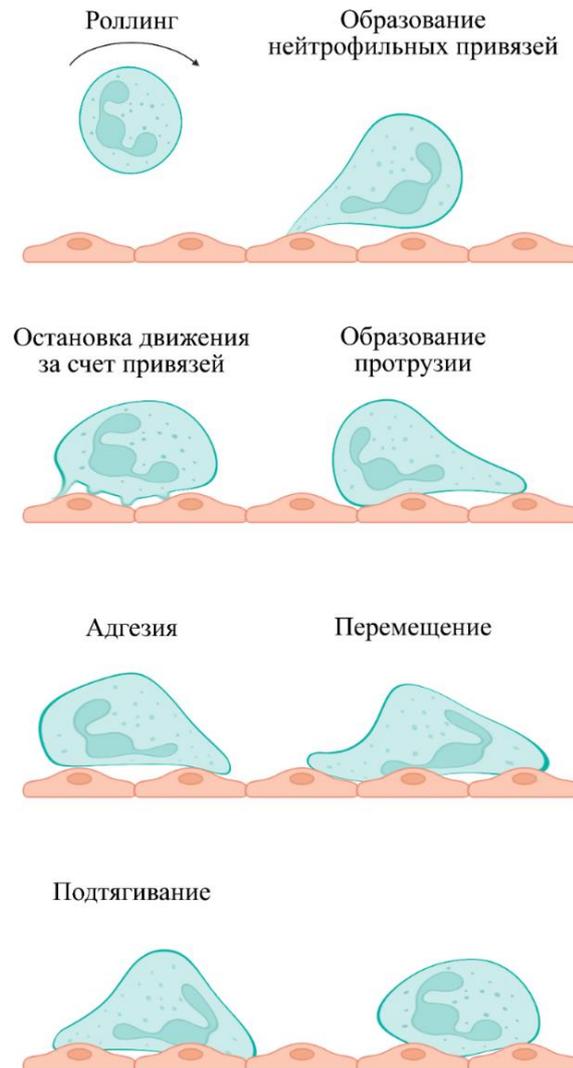


Рисунок 2 – Механика миграции нейтрофила в кровяном русле. При роллинге привязи нейтрофила, богатые PSGL-1 и LFA-1 связываются с P-селектином и ICAM-1 сосудистого эндотелия соответственно, тормозя движение нейтрофила вплоть до полной остановки. Далее нейтрофил сканирует окружение с помощью ламеллоподий и образует протрузию в сторону увеличения хемотаксического градиента. После адгезии протрузии происходит перемещение ядерной части нейтрофила в новую область, ретракция уropодии и подтягивание цитоплазмы к телу клетки. Движение продолжается до достижения области трансэндотелиальной миграции.

Скорость клеточной миграции определяется не только протрузионной активностью, но также силой адгезии и сократимостью клетки. Экспериментальные и теоретические данные показали, что максимальная скорость достигается при умеренных тянущих усилиях и силе адгезии [DiMilla et al., 1993], то есть быстро мигрирующие нейтрофилы характеризуются низкой адгезивностью и средней сократительной активностью. Наличие оптимального баланса скорости обусловлено взаимозависимостью и точной координацией протрузионной, адгезивной и сократительной активностей клетки, что обеспечивает эффективную локомоцию.

Достигнув области диапедеза нейтрофилы также преодолевают эндотелиальный барьер по хемотаксическому градиенту. Одними из ключевых хемотаксических рецепторов нейтрофилов, обеспечивающих диапедез, являются рецепторы лейкотриенов В4 типа 1 (BLT1). Они представляют собой GPCR, специфичные к лейкотриену В4 (LTB4) [Yokomizo et al., 2018]. LTB4 вырабатывается лейкоцитами в ответ на воздействие воспалительных медиаторов и может усиливать накопление нейтрофилов при остром воспалении или травме, напрямую привлекая нейтрофилы через BLT1 или выступая в качестве ретранслятора, поддерживающего хемотаксический градиент и направляющего миграцию нейтрофилов к хемоаттрактантам, например формилпептидам или C5a [Lammermann et al., 2013; Subramanian et al., 2018; Becker et al., 2024]. В условиях воспаления уровень LTB4 в крови увеличивается в 10 и более раз [Куликова и др., 2022]. Опосредованная рецептором BLT1 внутриклеточная сигнализация зависит от специфических подтипов G-белка, экспрессируемых в различных типах клеток. В гранулоцитах передача сигналов, индуцируемая LTB4, преимущественно реализуется через Gai2 [Yokomizo and Shimizu, 2023]. Связывание LTB4 с BLT1 активирует G-белки, которые запускают каскад киназ, фосфорилирующих нижестоящие сигнальные белки [Wang et al., 2015]. Например, BLT1-зависимый хемотаксис нейтрофилов требует активации путей PI3K и ERK, которые играют ключевую роль в установлении клеточной полярности и обеспечении направленной миграции [Chen et al., 2010; Devreotes

and Horwitz, 2015]. Также было продемонстрировано, что LTB4 повышает экспрессию провоспалительных цитокинов [Asahara et al., 2022]. Таким образом ось LTB4-BLT1 является ключевой в гомеостатическом контроле нейтрофилов и связана с состоянием хронических воспалительных заболеваний [He et al., 2020].

Широкий круг хемотаксических рецепторов усложняет выделение приоритетных путей хемотаксиса. В работе [Lundgren et al., 2023] предложена гипотетическая модель, в которой быстрая десенсибилизация низкоприоритетных хемотаксических рецепторов приводит к подавлению их сигнала постоянным сигналом высокоприоритетных рецепторов. Таким образом точное направление хемотаксиса определяется нейтрофилами посредством восприятия сложных сигналов хемоаттрактантов в тканях, что гарантирует им достижение областей инфекции или воспаления для осуществления эффекторных функций.

### **1.5 Фагоцитоз**

В очаге инфекции нейтрофилы фагоцитируют микроорганизмы. Наиболее эффективен фагоцитоз в том случае, если патогены опсонизированы. В качестве опсонинов выступают иммуноглобулины (IgG, IgM, IgA) и компоненты комплемента (C3b/iC3b, C4b), а чаще всего комплекс этих факторов [Pleskova et al., 2018]. Нейтрофилы распознают связанные с микроорганизмом опсонины благодаря рецепторам, экспрессируемым на клеточной мембране. Фагоцитоз запускает активацию множества внутриклеточных сигнальных путей, что приводит к динамической реорганизации актинового цитоскелета и формированию фагосом. Сигнальные пути фагоцитоза, опосредованные FcγR и рецепторами к белкам системы комплемента CR (в первую очередь CR1), активно участвуют в формировании фагосомы, обеспечивая распознавание, установление прочных межклеточных контактов и интенсификацию захвата микроорганизмов [Wang and Jönsson, 2019]. Рецепторы FcγR участвуют в процессе функциональной активации нейтрофилов в разных направлениях. В частности,

иммунные комплексы (ИК), образованные при тромбоцитопении, могут взаимодействовать с Fc $\gamma$ RIIa на мембране нейтрофилов, вызывая образование NETs, что приводит к тромбозу [Aleman and Rosales, 2023].

Внутри образующихся фагосом запускаются два основных цитотоксических механизма: (1) генерация АФК посредством никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФН)-оксидазы специфических гранул и (2) высвобождение бактерицидных белков из специфических и азурофильных гранул [Naish et al., 2023]. В нейтрофилах идентифицированы четыре типа гранул с уникальным составом и специализацией: специфические, азурофильные, желатиновые и секреторные везикулы. Специфические гранулы содержат НАДФН-оксидазу, лизоцим, лактоферрин и коллагеназу. Азурофильные гранулы – лизоцим, МПО, лейкоцитарную эластазу, кислые гидролазы, и сериновые протеазы, а также дефензины. Желатиновые гранулы содержат ММП, в первую очередь желатиназу В (ММП9), а также аминопептидазу, и служат для внеклеточного расщепления белков. Секреторные везикулы, в свою очередь, содержат щелочную фосфатазу и несут на своей поверхности рецепторы, в том числе CR, сиалиновый антиген Льюиса X (CD15) и CD11b/CD18 [Ярилин, 2010]. Во время формирования и созревания фагосомы слияние гранул с ней выполняет две важные функции: доставку антимикробных корпускулярных белков в просвет фагосомы и включение мембранных белков в мембрану фагосомы. К последним относятся ионные каналы, протонные насосы, TLR рецепторы, SNARE белки и ферменты: НАДФН-оксидаза 2 (NOX2), липазы, протеазы, и нуклеазы. Активация НАДФН-оксидазы – это динамический процесс, организованный каскадом киназной сигнализации, высвобождением кальция и активацией малых ГТФаз, завершающийся активацией NOX2 [Paclet et al., 2022]. Превалирующий механизм уничтожения микроорганизма не определен. Выбор основного механизма (окислительного или неокислительного) зависит от патологического процесса. Если один механизм затруднен, другой служит альтернативной компенсаторной системой. При этом в процессе сепсиса повышенная выработка АФК и окислительный стресс часто сопряжены с

отрицательным прогнозом [Landskron et al., 2014]. Было обнаружено, что во время сепсиса в головном мозге наблюдается массивная гиперпродукция супероксид-аниона ( $O_2^-$ ), оксида азота (NO) и пероксинитрит-аниона ( $ONOO^-$ ) и разрушение антиоксидантных ферментов, таких как супероксиддисмутаза (СОД) и каталаза [Zarbato et al., 2018]. Из-за сверхпродукции АФК начинается перекисное окисление липидов, снижается текучесть мембран и происходит дисфункция головного мозга [Tang et al., 2017]. Активация сигнального пути p38 активными формами кислорода приводит к лёгочной недостаточности [Gan et al., 2018]. Повреждение кардиомиоцитов АФК, вызывает септическую кардиомиопатию [Lu et al., 2022].

Флуктуации внутриклеточного уровня  $Ca^{2+}$  также являются важной характеристикой активации нейтрофилов. Поток  $Ca^{2+}$  активирует протеинкиназу С, играющую ключевую роль в управлении НАДФН-оксидазой [Vanoth and Cassel, 2018]. Процесс сопровождается перестройками цитоскелета, влияющими на полярность и направление движения клеток [Watson et al., 2023].

## **1.6 Механизмы гибели нейтрофила в очаге инфекции**

Завершение функционального цикла и уничтожение патогена чаще всего заканчивается гибелью нейтрофила. Механизм гибели определяет развитие воспалительного процесса: нелитическая гибель нейтрофила приводит к разрешению воспаления и восстановлению гомеостаза, а литическая – к усилению воспаления и альтерации тканей.

Основным запрограммированным противовоспалительным механизмом гибели нейтрофила является апоптоз, в результате которого клетка распадается на апоптотические тельца, ограниченные плазматической мембраной, что препятствует высвобождению содержимого гранул во внешнюю среду [Lawrence et al., 2020; Nosevkina et al., 2021]. Апоптоз нейтрофилов в зависимости от механизма возникновения подразделяется на две формы: внешний апоптоз, который запускается рецепторами на поверхности клетки, и внутренний апоптоз,

который запускается изменениями в митохондриях [Kobayashi et al., 2024]. Проапоптотические димеры семейства Bcl-2 и рецептор смерти Fas участвуют во внутреннем сигнальном пути смерти, организуя апоптоз через каспаз-зависимый механизм [Ranjan and Pathak, 2024]. Гибель клеток, вызванная внешним воздействием, связана с поглощением микроорганизмов и ксенобиотиков [Ramos and Oehler, 2024]. Внешний путь апоптоза также зависит от локальной продукции АФК [Bagaitkar et al., 2018]. Погибшие клетки поглощаются макрофагами и другими нейтрофилами [Ramos and Oehler, 2024] через специализированные фагоцитарные механизмы, в частности эффероцитоз [Morioka et al., 2019]. Неэффективный клиренс апоптотических нейтрофилов приводит к некрозу и высвобождению содержимого гранул и DAMP во внеклеточное пространство, что усугубляет локальную воспалительную реакцию и повреждение тканей.

К провоспалительным механизмам гибели нейтрофила относят механизмы, сопровождающиеся автолизом клетки и высвобождением провоспалительных хемокинов и ферментов гранул во внеклеточную среду [Thieblemont et al., 2018; Brostjan and Oehler, 2020]. Их можно разделить на запрограммированные, которые ограничено запускаются для более эффективного уничтожения микроорганизмов, и неконтролируемые. Среди запрограммированных провоспалительных подвидов литической гибели нейтрофилов основными являются некроптоз, пироптоз и ферроптоз. Некроптоз действует независимо от нормальной передачи апоптотического сигнала и запускается киназами RIPK1, RIPK3 и MLKL. Некроптоз нейтрофилов может быть инициирован различными стимулами, включая ФНО, TLR и рецепторами адгезии, в том числе CD11b и CD18 [Wicki et al., 2016; Brostjan and Oehler, 2020], а также процессом аутофагии [Germic et al., 2019]. Пироптоз регулируется расщеплением гасдермина D воспалительными каспазами и сопровождается образованием пузырькообразных выпячиваний (пироптотических телец), которые вызывают разрыв клеточной мембраны с высвобождением цитоплазматического содержимого, в частности провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$  и IL-18 [Shi et al., 2014; Yu et al., 2021]. Ферроптоз характеризуется железо-

зависимым накоплением и перекисным окислением содержащих полиненасыщенные жирные кислоты фосфолипидов до достижения летальных концентраций в клеточной мембране [Stockwell et al., 2017]. Основным неконтролируемым провоспалительным механизмом гибели нейтрофилов является некроз. При воспалении некроз вызывается прямым повреждением клеточной мембраны, окислительным стрессом, воздействием токсичных цитокинов и протеолитических ферментов в больших концентрациях или поглощением чрезмерно крупных микроорганизмов и их фрагментов.

Образование NETs или нетоз – особая регулируемая форма программируемой клеточной гибели нейтрофилов. В воспалительном процессе NETs играют двойственную роль. Как правило, сложный процесс их образования инициируется распознаванием сигнальных молекул, бактерий, бактериальных факторов патогенности и воспалительных факторов [Vaz et al., 2024]. После инициации ядерная мембрана разрывается, и декомпрессированная ядерная ДНК высвобождается в цитоплазму. Высвобождение может сопровождаться литической гибелью клетки с выбросом всей ДНК (классический нетоз) или быть обратимым в случае локального высвобождения части наследственного материала (быстрый нетоз) [Плескова и др., 2019]. ДНК смешивается с клеточными компонентами, включая гранулы, гистоны и цитоплазматические белки, нанося ущерб микроорганизмам во внеклеточном пространстве [Eustache et al., 2020]. Классический литический механизм образования NETs запускается в случае связи лиганда с клеточным рецептором, инициирующим передачу сигнала Raf-MEK-ERK и мобилизацию комплекса НАДФН-оксидазы с повышением уровня цитоплазматических АФК. Далее МПО синергетически с нейтрофильной эластазой (НЭ) запускает реакции, нарушающие упаковку хроматина, и вызывающие его деконденсацию. Ядро вместе с хроматином расширяется, что приводит к лизису клетки [Sollberger et al., 2018]. Нелитический обратимый механизм вызывается увеличением концентрации цитоплазматического кальция, активирующего белок аргининдезимиразу 4 (PAD4). С его помощью происходит цитруллинирование остатков аргинина на

гистонах, положительный заряд снижается, и гистоны постепенно теряют электростатическое сродство к ДНК. Это приводит к расширению хроматина вдоль ядра с образованием NETs [Leshner et al., 2012]. Продуцирующие NETs в такой форме нейтрофилы сохраняют жизнеспособность и выполняют нормальные функции после локального высвобождения NET, включая хемотаксис и фагоцитоз [Плескова и Крюков, 2019].

Помимо своей основной роли в улавливании патогенов, NETs участвуют в ряде патологических состояний если образуются в избыточном количестве из-за нарушения регуляции и механизмов элиминации. К этим эффектам относятся длительное заживление ран, системные воспалительные реакции, нарушение иммунного надзора, кристаллическая артропатия, тромбоз и облегчение метастазирования рака [Eutache et al., 2020; Ronchetti et al., 2021; Schoen et al., 2022; James et al., 2024]. Самым интересным является влияние NETs на процесс трансэндотелиальной миграции. Было показано, что выброс NETs способствует увеличению проницаемости сосудов и эндотелиально-мезенхимальному переходу посредством деградации VE-кадгерина и последующей активации сигнальных путей  $\beta$ -катенина за счет действия НЭ [Pieterse et al., 2017; Stehr et al., 2022]. В то же время было показано, что NETs ухудшают обратную миграцию нейтрофилов при повреждении головного мозга [Zhou et al., 2025].

### **1.7 Обратная миграция нейтрофилов**

Обратная миграция нейтрофилов из очага инфекции в сосудистое русло является сравнительно недавно открытой альтернативой гибели клетки. В настоящее время обратная миграция нейтрофилов была исследована в моделях данио-рерио [Elks et al., 2011], мышей [Woodfin et al., 2011], и на человеческих клетках *in vitro* [Hamza et al., 2014]. Было предложено несколько механизмов для объяснения обратной миграции нейтрофилов из воспаленной ткани. Снижение экспрессии молекулы адгезии-С (JAM-C – *junctional adhesion molecule C*) в эндотелиоцитах, связанное с действием CIRBP (*cold-inducible RNA-binding*

*protein*) [Jin et al., 2019], может приводить к обратной миграции нейтрофилов за счет изменения поляризации эндотелиальных клеток [Colom et al., 2015]. Более того, такие хемоаттрактанты как CXCL8, могут действовать как хеморепелленты в более высоких концентрациях [Tharp et al., 2006], что провоцирует обратную миграцию нейтрофилов. Также с ретроградной миграцией нейтрофилов могут быть связаны уровни липидных медиаторов. Переключение классов липидных медиаторов может приводить к изменениям в путях продукции провоспалительных липидных медиаторов, которые, в свою очередь, продуцируют проабсорбционные медиаторы. Таким образом может происходить смещение продукции LTB<sub>4</sub> на продукцию индуктора обратной миграции липоксина A<sub>4</sub> (LXA<sub>4</sub>) [Serhan et al., 2014; Zong et al., 2017; Ji and Fan, 2021].

Теоретически, своевременное удаление нейтрофилов в фазе разрешения из воспаленного участка должно помочь купировать местное воспаление. Однако активированные нейтрофилы, мигрирующие обратно в системный кровоток, могут распространять воспалительные реакции на отдаленные органы и ткани. Воспалительные медиаторы, выделяемые нейтрофилами, могут усиливать активацию других клеток, реализующих механизмы неспецифической резистентности, включая подключение все новых и новых нейтрофилов [de Oliveira et al., 2016]. Обратно мигрировавшие нейтрофилы демонстрируют провоспалительный фенотип, включая повышенную продукцию супероксида и высокую мембранную экспрессию ICAM-1 [Ode et al., 2018]. Кроме того, обратно мигрировавшие нейтрофилы демонстрируют бóльшую продолжительность жизни и отсроченный апоптоз [Zhang et al., 2015; Ng et al., 2019], что может способствовать персистирующему и усиленному воспалению [Woodfin et al., 2016]. Исследования с использованием модели абдоминальной инфекции у мышей показали, что соотношение обратно мигрировавших нейтрофилов в кровотоке показывает положительную корреляцию с острым повреждением легких [Jin et al., 2019]. Обратно мигрировавшие нейтрофилы продуцируют избыточное количество индуцибельной NO-синтазы (iNOS) и NETs и способствуют воспалению и повреждению тканей [Ode et al., 2018].

Использование другой модели сепсиса (модели острого панкреатита) показало, что продукция LTB<sub>4</sub>, являющегося классическим хемоаттрактантом нейтрофилов в ткани, может стимулировать обратную миграцию нейтрофилов, опосредованную веществом Р [Li et al., 2018]. Обработка веществом Р усиливает фосфорилирование протеинкиназы С и митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК), что дополнительно стимулирует продукцию LTB<sub>4</sub>. Блокирование BLT1 привело к снижению количества вернувшихся в кровотоки нейтрофилов.

Помимо обратной миграции, стареющие нейтрофилы проявляют повышенную чувствительность к CXCL12 в костном мозге за счет повышения экспрессии CXCR4 на поверхности мембраны. Стареющие нейтрофилы направляются обратно в костный мозг, где подвергаются апоптозу и впоследствии фагоцитируются стромальными макрофагами [Martin et al., 2003]. Обратная миграция является возможным механизмом локального разрешения воспаления и мишенью для противовоспалительной терапии. Однако регуляция обратной миграции слабо изучена, а ее последствия остаются непредсказуемыми.

### **1.8 Нейтрофилы и заболевания человека**

В последние годы нейтрофилы всё чаще стали рассматриваться как участники и модуляторы широкого спектра заболеваний. Они демонстрируют фенотипическую и функциональную гетерогенность, демонстрируя гораздо более высокий уровень многогранности, чем предполагалось ранее. Например, многие заболевания, сопровождающиеся сосудистым воспалением, связаны с нарушением регуляции гомеостаза нейтрофилов [Ambler and Kaplan, 2024]. Однако основным инфекционным заболеванием, напрямую связанным с функциями нейтрофилов, остается сепсис. Сепсис – это персистирующее системное воспалительное заболевание, характеризующееся полиорганной недостаточностью вследствие нарушения иммунного ответа на инфекцию [Singer et al., 2016]. Нейтрофилы, являясь основной линией защиты от

проникновения микроорганизма, реализуют свои эффекторные функции посредством трёх основных механизмов: дегрануляции, фагоцитоза и высвобождения NETs [Adhover et al., 2020]. Однако при сепсисе нейтрофилы с увеличенной продолжительностью жизни и нарушенной миграцией ограничены сосудистым руслом, вызывая выраженное сосудистое воспаление за счёт высвобождения провоспалительных цитокинов, АФК и NETs [Sonego et al., 2016], что в конечном итоге приводит к эндотелиальной дисфункции. Было высказано предположение, что нарушенная миграция нейтрофилов у пациентов с сепсисом может быть связана с меньшей пластичностью ядер, препятствующей прохождению нейтрофила через образующийся просвет [Salvermoser et al., 2018; Qi et al., 2024]. Сепсис усиливает экспрессию лиганда 1 программируемой клеточной смерти (PD-L1 – *Programmed Death-Ligand 1*) на нейтрофилах, запуская апоптоз лимфоцитов и вызывая иммуносупрессию [Wang et al., 2015]. Сепсис также может активировать TLR2 на нейтрофилах, что приводит к снижению регуляции CXCR2 и нарушению хемотаксиса [Alves-Filho et al., 2009]. Активация TLR может привести к экспрессии CCR2, который отсутствует в нейтрофилах в физиологических условиях, вызывая неадекватную инфильтрацию нейтрофилов в дистальные органы, что может привести к дальнейшему повреждению тканей в таких органах, как легкие, печень и почки [Seree-Arphinan et al., 2020]. Одним из отличительных признаков сепсиса является эндотелиальная дисфункция. Эндотелиальная дисфункция может привести к нарушению вазоконстрикции, влияя на микроциркуляторный кровоток, усугубляя дефицит перфузии тканей у пациентов с сепсисом и в конечном итоге приводя к полиорганной недостаточности [Zhang et al., 2023]. NETs выполняют двойную функцию в сосудистой системе: захватывают патогены для предотвращения их распространения и опосредуют тромбоз [Aleman and Rosales, 2023]. Тромбоз, вызванный NETs, способствует ишемическому повреждению органов и диссеминированному внутрисосудистому свертыванию (ДВС-синдром) [Chan et al., 2021]. Нейтрофилы и NETs повреждают гликокаликс эндотелиальных клеток и увеличивают проницаемость эндотелия, что может в

дальнейшем привести к нарушению регуляции воспаления, нарушению микроциркуляторного кровотока, недостаточной перфузии тканей и опасной для жизни органной недостаточности [Joffre et al., 2020]. При сепсисе чрезмерная активация нейтрофилов и высвобождение NETs приводят к изменению профиля эндотелия с противовоспалительного и антикоагулянтного на провоспалительный и прокоагулянтный фенотип. Клиническое лечение сепсиса в настоящее время основано на антибиотикотерапии, инфузионной терапии и поддерживающей терапии. Таким образом, регуляция высвобождения NETs может быть потенциальной терапевтической стратегией для лечения сепсиса.

Несмотря на значительные успехи в понимании воспалительных и аутоиммунных заболеваний, в настоящее время подавление чрезмерного воспаления достигается в первую очередь за счет неспецифических иммунодепрессантов: антагонистов и ингибиторов рецепторов, а также моноклональных антител к провоспалительным цитокинам [Strzelec et al., 2023; Zhang et al., 2025]. Данный подход является сравнительно эффективным, но его низкая специфичность приводит к системному угнетению иммунитета, что нарушает восстановление организма, провоцирует вторичные инфекции и побочные эффекты со стороны тканей и органов. Стимуляция локальной обратной миграции нейтрофилов представляется интересной альтернативной стратегией разрешения воспаления. Однако исследования этого механизма находятся в начальной стадии, и неясно, оказывает ли обратная миграция нейтрофилов с выраженным провоспалительным фенотипом пагубное воздействие на повреждение дистальных органов или системную иммуносупрессию [de Oliveira et al., 2016]. Новые методы лечения, основанные на стратегиях контроля миграции нейтрофилов, продемонстрировали значительные преимущества при некоторых воспалительных заболеваниях [Wang et al., 2024].

Современные методы исследования демонстрируют, что нейтрофилы представляют собой значительно более сложные клетки, чем считалось ранее, а накопленные данные свидетельствуют об их всё более значимой роли в

физиологических и патологических процессах. Вместе с тем хемотаксическая миграция нейтрофилов в условиях сложных воспалительных сред, а также их гетерогенность остаются недостаточно изученными аспектами, требующими дальнейшего научного осмысления. Анализ сигнальных путей, регулирующих хемотаксическую миграцию нейтрофилов, может способствовать углублённому пониманию их функционального разнообразия и роли в развитии воспалительных заболеваний. Кроме того, изучение морфо-механических трансформаций клеток, лежащих в основе хемотаксической миграции нейтрофилов, открывает перспективы для разработки целевых терапевтических подходов, направленных на модуляцию их миграционной активности и эффекторных функций. Для достижения значительного прогресса в области иммунотерапии необходимо проведение дополнительных исследований, направленных на изучение функциональных свойств нейтрофилов, что позволит минимизировать потенциальный ущерб для организма хозяина.

## **2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **2.1 Материалы исследования**

Исследование было выполнено на базе кафедры физиологии и анатомии Института биологии и биомедицины и в научно-исследовательской лаборатории сканирующей зондовой микроскопии научно-образовательного центра «Физика твердотельных наноструктур» Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» в соответствии с требованиями законодательства РФ, этическими нормами и принципами Хельсинкской декларации от 1964 года. Исследование было одобрено комиссией по биоэтике ННГУ им. Н.И. Лобачевского (протокол № 9 от 17.07.2017 г.). Все образцы цельной крови были взяты у добровольцев после подписания добровольного согласия на забор и использование биоматериала. Объектом исследования являлись пробы цельной крови (выделенные из них нейтрофилы) и перевиваемая эндотелиальная клеточная линия EA.hy926 полученная путем гибридизации клеток аденокарциномы легкого A549 с первичной линией эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC), любезно предоставленная д.м.н., проф. С.А. Сельковым и д.б.н. Д.И. Соколовым, НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург.

### **2.2 Методы исследования**

#### **2.2.1 Выделение нейтрофилов**

Нейтрофилы выделялись непосредственно перед началом экспериментов по методу Подосинникова и соавторов [Подосинников и др., 1981] для сохранения функциональной активности клеток. Выделение проводилось в покрытых силиконом пробирках, во избежание преждевременного праймирования нейтрофилов.

Забор крови осуществлялся из локтевой вены здоровых добровольцев, цельная кровь разводилась в равном объеме стерильного физиологического раствора (СФР) (0,154 М NaCl, концерн «ЭСКОМ», Ставрополь) с внесенным для стабилизации гепарином натрия (50 ЕД, ФГУП «Московский эндокринный завод», Москва). Фракционирование нейтрофилов проводилось центрифугированием (400g, 40 мин, ELM1 CM-6MT, Biosan, Латвия) на двойном градиенте фикола-тразографа ( $\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$ ;  $\rho = 1,110 \text{ г/см}^3$ , Диа-М, Москва; JBCPL, Мумбаи, Индия). Фракция нейтрофилов отбиралась пипеткой Пастера и отмывалась СФР (400 g, 3 мин). Лизирование (4 °С, 15 мин) остаточных эритроцитов проводилось 0,168 М раствором  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (AppliChem GmbH, Германия). Чистая фракция нейтрофилов повторно отмывалась СФР (400 g, 3 мин). Выделенные нейтрофилы взвешивались в растворе Хенкса (РХ), забуференном 0,01 М 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислотой (HEPES) (оба ПанЭко, Москва) с рН 7,3. Подсчет выделенных клеток осуществлялся в камере Горяева после окрашивания нейтрофилов (20 мкл клеточной суспензии на 200 мкл жидкости Тюрка). Подсчет проводился в трех широких столбцах с нахождением среднего арифметического и умножением полученного числа на 200 тыс. клеток. Суспензия нейтрофилов в забуференном HEPES РХ с конечной концентрацией  $10^6$  кл/мл использовалась в экспериментах. Жизнеспособность клеток оценивалась по окрашиванию йодистым пропидием (PI) (Sigma, США) в концентрации 1 мкг/мл. В эксперимент брались клетки с жизнеспособностью не менее 97%.

### **2.2.2 Культивирование эндотелиальных клеток EA.hy926**

Клетки EA.hy926 культивировались в  $\text{CO}_2$  инкубаторе Portable Mini NB 203M (N-Biotek, Южная Корея) при 37 °С и при содержании  $\text{CO}_2$  5 % в среде DMEM-F12 (ПанЭко, Москва), с добавлением 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (Biowest, Франция), 100 мкг/мл стрептомицина, 100 ЕД/мл пенициллина, 8 мМ L-глутамин, ГАТ (50 мкМ гипоксантина, 0,2 мкМ аминоптерина, 8 мкМ тимидина) (все – ПанЭко, Москва).

Пересев клеточных линий осуществлялся каждые 3-4 дня по общепринятой методике [Marin et al., 2001], для этого монослой трижды дезагрегировался 0,25% раствором трипсин-ЭДТА (ПанЭко, Москва) в течение 3 мин. Пересадка клеток осуществлялась по достижении 90-100 % конfluence. В экспериментах использовались клетки 3-20 пассажей в концентрации  $2,5 \times 10^5$  кл/мл.

### 2.2.3 Приготовление бактериальных суспензий

Бактериальные штаммы (*Staphylococcus aureus* 2879M, *Escherichia coli* 321, *Enterococcus faecalis* 645-p2, *Proteus mirabilis* 649-2) были получены из музея кафедры «Нанотехнологии и биотехнологии» федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Нижегородский государственный технический университет им. Р.Е. Алексеева». Суточные культуры выращивались на плотном скошенном ГРМ-агаре (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) (37 °С, 18 ч), смывались СФР и трижды отмывались им же (1500g, 5 мин). Концентрации бактериальных суспензий определялись на спектрофотометре СПЕКС ССП 705 (Спектроскопические системы, Москва) при длине волны  $\lambda = 670$  нм. В экспериментах использовались бактериальные суспензии с начальной концентрацией  $10^9$  кл/мл, для чего оптическая плотность суспензий доводилась до 0,74 для *S.aureus* 2879M; 0,85 для *E.coli* 321; 0,69 для *P.mirabilis* 649-2 и 0,67 для *E.faecalis* 645-p2. Конечная концентрация выбиралась в экспериментах согласно числу MOI (*Multiplicity of infection*) относительно количества нейтрофилов. Расчет MOI осуществлялся по формуле 1 и описывал количество бактерий на каждый нейтрофил.

$$MOI = \frac{n_{\text{бактерий}}}{n_{\text{нейтрофилов}}}, \quad (1)$$

### 2.2.4 Подбор среды исследования

Для обеспечения жизнеспособности и функциональной активности как нейтрофилов, так и эндотелиальных клеток в длительных экспериментах, были апробированы среды: RPMI-1640 (ПанЭко, Москва), СФР, фосфатно-солевой буфер (ФСБ), РХ, DMEM-F12 и РХ, забуференный 0,01 М HEPES. Для оценки выживаемости суспензии клеток в рабочих концентрациях инкубировались в

исследуемых средах в четырех повторностях (37 °С, 2 ч). Каждые 30 минут регистрировался рН среды (FiveEasy, MettlerToledo, Швейцария), как ключевой показатель, влияющий на выживаемость клеток. По окончании эксперимента процент живых клеток определялся с помощью проточного цитофлуориметра CytoFLEX S (Beckman Coulter International S. A., США) после окрашивания клеток с 1 мкг/мл PI.

РХ забуференный 0,01 М HEPES был определен как оптимальная среда для обоих типов клеток (таблица 1) и использовался во всех дальнейших экспериментах.

Таблица 1 – Изменение рН среды и жизнеспособности нейтрофилов и эндотелиоцитов линии EA.hy926 при инкубации в различных питательных средах.

Буфер	рН					Жизнеспособность, %			
	Изна- чально	EA.hy926		нейтрофилы		EA.hy926		нейтрофилы	
		60 мин	120 мин	60 мин	120 мин	60 мин	120 мин	60 мин	120 мин
СФР	7,40	6,79	6,67	7,72	7,91	89,0 ± 3,0	89,1 ± 2,5	82,1 ± 7,4	79,8 ± 6,5
ФСБ	7,55	7,15	7,12	7,58	7,69	92,2 ± 0,2	73,3 ± 9,7	83,3 ± 5,6	81,8 ± 6,7
РХ	7,27	6,86	6,95	7,25	7,49	92,4 ± 1,1	90,9 ± 0,8	95,6 ± 0,7	94,7 ± 0,6
РХ + 0,01 М HEPES	7,38	7,04	7,08	7,35	7,42	93,8 ± 0,2	87,6 ± 1,4	94,9 ± 0,9	94,4 ± 1,8
RPMI- 1640	7,85	7,64	7,70	7,59	7,63	93,2 ± 0,5	73,9 ± 3,6	91,3 ± 4,5	89,9 ± 2,8
DMEM- F12	7,75	7,65	7,74	7,6	7,69	93,4 ± 0,6	83,1 ± 7,5	92,9 ± 2,1	91,8 ± 1,5

## 2.2.5 Создание миграционных моделей

### 2.2.5.1 Вертикальная модель трансэндотелиальной миграции нейтрофилов

Вертикальная модель миграции представляла собой модифицированную камеру Бойдена с двумя отсеками, моделирующими сосудистое русло и очаг инфекции в ткани, разделенными барьером эндотелиальных клеток. Эндотелиальные клетки стерильно выращивались по методике, описанной в разделе 2.2.2 на культуральных вкладышах с поликарбонатной мембраной с адгезионным покрытием и диаметром пор 3 мкм (SPL Lifesciences, Республика Корея) и общим диаметром 6,5 мм. Мембраны с эндотелиальными клетками культивировались в CO<sub>2</sub> инкубаторе (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 72 ч). Формирование монослоя контролировалось с помощью оптического микроскопа Axio Vert.A1 (Carl Zeiss, Германия).

Для фиксации культуральных вкладышей в чашке Петри между отсеками камеры Бойдена, в программном обеспечении AutoCAD (Autodesk Inc., США) моделировались вставки. Изготовление полиэтиленгликольтерефталатных (ПЭТГ) вставок осуществлялось на 3D-принтере QQ-S PRO с прямым экструдером (FLsun, Китай). Модель и готовое изделие представлены на рисунке 3.

Камеры стерилизовались в 6 % перексиде водорода (Sigma, США) (6 ч). После стерилизации камеры промывались проточной стерильной дистиллированной водой, после чего высушивались на воздухе. Стерилизация камер осуществлялась между каждым экспериментом.

Для моделирования миграции вставка устанавливалась в стерильную чашку Петри диаметром 35 мм (Corning Inc., США), в ней закреплялся культуральный вкладыш с выращенным монослоем клеток EA.hy926. В верхний отсек камеры вносились нейтрофилы в концентрации 10<sup>6</sup> кл/мл. В нижний отсек вносился бактериальный штамм в концентрации MOI 10.

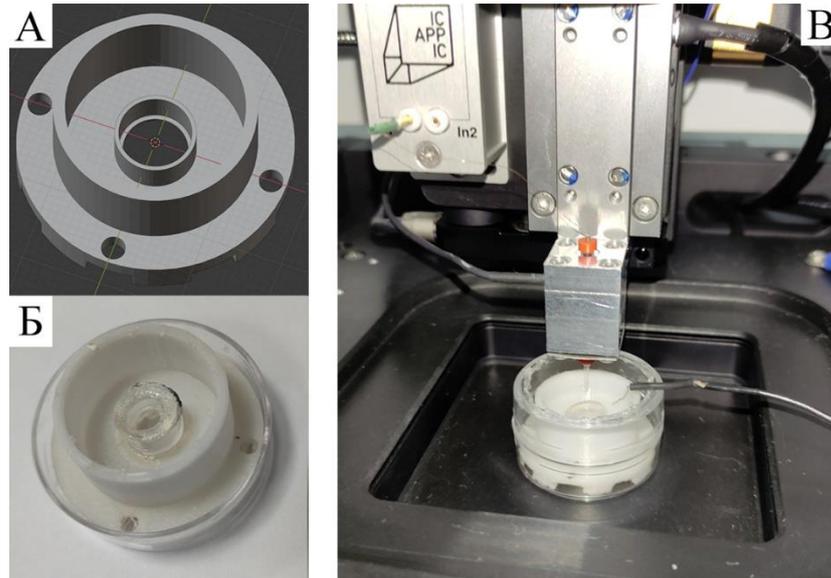


Рисунок 3 – Система для исследования трансэндотелиальной миграции нейтрофилов зондовыми методами: (А) – трехмерная модель; (Б) – готовое изделия с закрепленной мембраной с выращенным монослоем эндотелиальных клеток; (В) – процесс экспериментального сканирования в модели.

Схема модели представлена на рисунке 4. Для доказательства миграции нейтрофилов в нижнюю камеру использовались методы проточной цитофлуометрии и флуоресцентной микроскопии. Для выявления некротической и апоптотической гибели клеток использовался набор для определения некроза и апоптоза (ООО «Люмипроб РУС», Москва). Перед окрашиванием отбиралась суспензия нейтрофилов, мигрировавших в нижнюю камеру за 2 часа, отмывалась от среды центрифугированием (400 g, 7 мин) и исследовалась на проточном цитофлуориметре CytoFLEX S. Адгезировавшиеся нейтрофилы на дне камеры фиксировались 70 % раствором этанола для последующей окраски и исследования методом флуоресцентной микроскопии (AxioVert A1, Германия). Выделенные из суспензии нейтрофилы и фиксированные нейтрофилы окрашивались аналогично. Для этого к клеткам добавлялся раствор Annexin V-FITC и PI в Binding Buffer. Клетки инкубировались с раствором красителей 15 мин с последующей двукратной отмывкой СФР и дистиллированной водой (2 мин). Для окрашивания антителами к клеткам вносился сначала блокирующий буфер (1 % бычьего сывороточного альбумина (Диа-М, Москва), 10 % телячьей эмбриональной сыворотки в ФСБ), затем первичные антитела АВclonal citrulline-

Histone H3-R2/R8/R17 Rabbit pAb (ABclonal, Китай) в разведении 1:500 и mouse anti-Homo sapiens (Human) MPO monoclonal antibody (Cusabio, Китай) в разведении 1:500 и нейтрофилы инкубировались (4 °C, 12 ч). Затем нейтрофилы промывались 3 раза 0,1 % раствором Твин-20 в ФСБ. Вторичные антитела ABflo® 488-conjugated Goat anti-Mouse IgG (H+L) (ABclonal, Китай) в разведении 1:200, ABflo® 594-conjugated Goat anti-Rabbit IgG (H+L) (ABclonal, Китай) в разведении 1:200 вносились к нейтрофилам на 60 мин. Затем клетки отмывались 3 раза 0,1% раствором Твин-20 в ФСБ. При проточной цитометрии для детекции флуоресценции PI использовался канал 690/50. Для детекции флуоресценции Annexin V-FITC использовался канал 525/40. При флуоресцентной микроскопии использовались фильтры Fs 45 (возбуждение BP 560/40, эмиссия BP 630/75) и Fs 46 (возбуждение BP 500/20, эмиссия BP 535/30).

Дальнейшие исследование в системе проводились методом сканирующей ион-проводящей микроскопии (СИПМ) для высокоразрешающей визуализации клеток и определения их вязко-упругих характеристик.

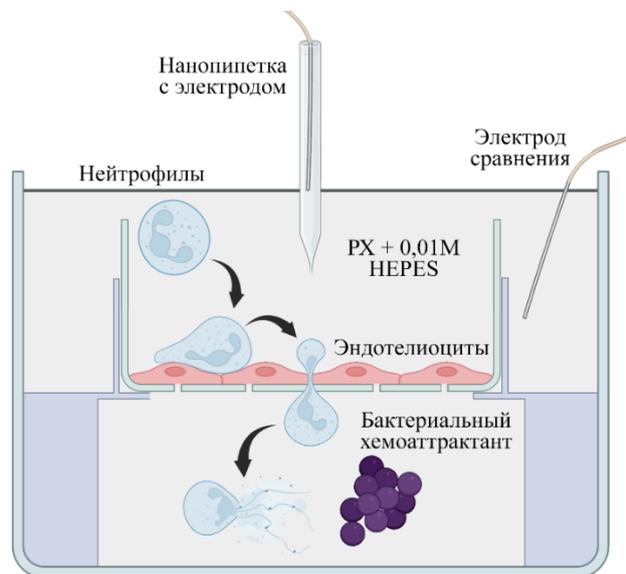


Рисунок 4 – Схема вертикальной модели трансэндотелиальной миграции НГ для исследования процесса методом СИПМ. Вкладыш с эндотелиальным монослоем фиксируется в ПЭТГ-вставке. Зонд СИПМ сканирует поверхность монослоя эндотелиальных клеток с мигрирующими сквозь них нейтрофилами, перемещающимися в созданный очаг инфекции в нижней камере.

Исследования методом СИПМ [Novak et al., 2009; Pleskova et al., 2020] проводились на сканирующем ион-проводящем микроскопе (ICAPPIC Ltd., Великобритания) с использованием зондов-нано pipеток с диаметром кончика до 100 нм, изготовленным на лазерном пуллере P-2000 (Sutter Instruments, США) (режим heat 310, filament 3, velocity 30, delay 160, pull 0; heat 330, filament 3, velocity 25, delay 160, pull 200) из боросиликатных капилляров B-12069-10F (RWD, Китай) с филаментом, внешним диаметром 1,2 мм и внутренним диаметром 0,69 мм. Ионный ток в системе регистрировали с помощью усилителя MultiClamp 700B (MolecularDevices, США) при постоянном подаваемом потенциале 200 мВ. Модуль Юнга клеток определялся по оказываемому нанопипеткой напряжению в диапазоне уменьшения ионного тока от 0,5 до 2 %. Расчет численных значений проводился по модели Clarke и соавторов [Clarke et al., 2016]. Принципиальная схема сканирования представлена на рисунке 5.

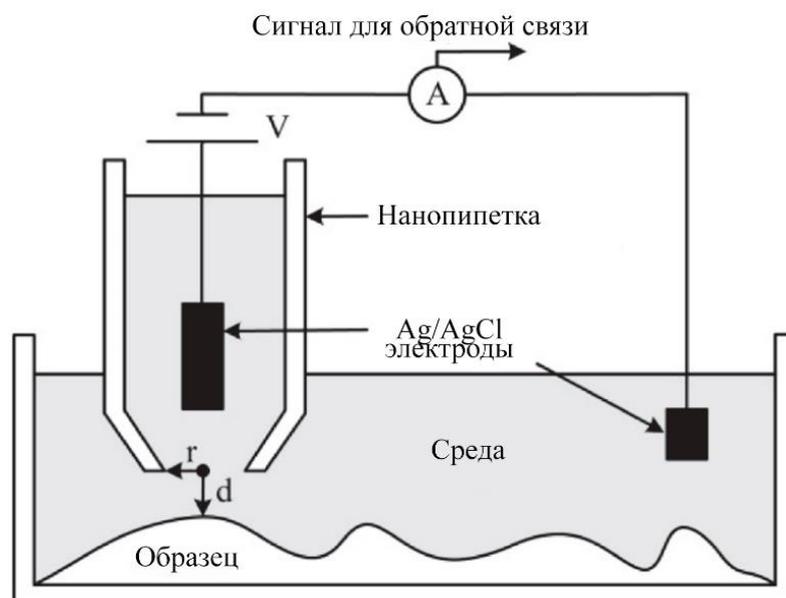


Рисунок 5 – Принципиальная схема работы сканирующего ион-проводящего микроскопа. Ток ионов в среде создается между двумя хлорсеребряными электродами: помещенным в капилляр с постоянным потенциалом на нем и электродом сравнения (земля), посредством усилителя. По мере приближения нанопипетки к поверхности ток уменьшается, что фиксируется амперметром и определяется как точка в пространстве через обратную связь с персональным компьютером. Нанопипетка перемещается над образцом по оси z, а сам образец передвигается столиком по осям x, y.

После окончания эксперимента проводилось сканирование нижней камеры на предмет прошедших сквозь эндотелий нейтрофилов после удаления вставки с вкладышем из чашки Петри. Полученные результаты обрабатывались с помощью программного обеспечения SICM ImageViewer (ICAPPIC Ltd., Великобритания).

### **2.2.5.2 Горизонтальная модель миграции нейтрофилов по градиенту хемоаттракции**

Для количественного подсчета миграции нейтрофилов по градиенту хемоаттракции выращивался монослой эндотелиальных клеток на 35 мм чашках Петри согласно разделу 2.2.2. На краю чашки помещался контейнер, представляющий собой полипропиленовую трубку, закрытую с нижней стороны диализной мембраной с диаметром пор 14 кДа (Solarbio, Китай). В чашку Петри помещался 1 мл  $10^6$  суспензии нейтрофилов, предварительно окрашенных 1 мкл 0,5 мкМ красителя активных форм кислорода 6-Карбокси- $H_2DCFDA$  (ООО «Люмипроб РУС», Москва) в течение 15 минут. Отсутствие токсического воздействия красителя на нейтрофилы было подтверждено на проточном цитофлуориметре, при окрашивании 1 мкг/мл PI выживаемость составила 98 %. В контейнер вносился бактериальный хемоаттрактант в концентрации MOI 20 или биохимический хемоаттрактант, участвующий в процессе хемотаксиса: 0,3 нМ LTB<sub>4</sub>, 0,3 нМ LXA<sub>4</sub> (оба – Cayman Chemical, США) или 0,5 нг/мл ФНО $\alpha$  (ООО «СайСторЛаб», Москва). В серии экспериментов проводилось совмещение двух контейнеров с бактериальным и биохимическим хемоаттрактантом. В чашках Петри на равном удалении от контейнера с хемоаттрактантом оптически регистрировалась миграция нейтрофилов в течение часа с интервалом съемки 2 мин с параллельной детекцией флуоресценции (с использованием фильтра Fs 46 (возбуждение BP 500/20, эмиссия BP 535/30)) при увеличении 10 $\times$  (AxioVert.A1, Carl Zeiss, Германия). Полученные серии изображений обрабатывались с помощью программного обеспечения Icy (Institut Pasteur and France-BioImaging, Франция) для построения треков движения нейтрофилов, определения дистанции перемещения и его направления. При обработке использовалась

математическая модель, описанная Chenouard и соавторами [Chenouard et al., 2013]. Параллельно проводились эксперименты в аналогичной модели без эндотелиального монослоя: нейтрофилы мигрировали непосредственно по поверхности чашки Петри.

В аналогичной системе проводились исследования методом СИПМ согласно методике, описанной в разделе 2.2.5.1. Дополнительно в серии экспериментов окрашивался F-актин в нейтрофилах. Для этого клетки инкубировались с красителем Cell Mask (Invitrogen, США) (возбуждение 652 нм; эмиссия 669 нм) в разведении 1:1000 в течение 30 мин (37 °С, 5 % CO<sub>2</sub>). Визуализация проводилась на уникальной научной установке «сканирующий ион-проводящий микроскоп с конфокальным модулем». Схематично модель представлена на рисунке 6.

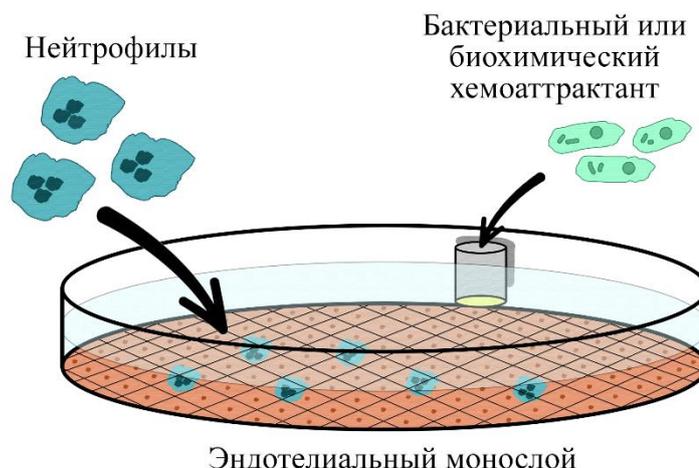


Рисунок 6 – Принципиальная схема горизонтальной модели миграции нейтрофилов: НГ вносятся на поверхность выращенного монослоя EA.hy926 и мигрируют по градиенту, создаваемому хемоаттрактантом (бактериальным или биохимическим), внесенным в контейнер с диализной мембраной.

### 2.2.5.3 Проточная модель миграции нейтрофилов

Для моделирования миграции нейтрофилов в условиях гемодинамики кровяного русла использовалась проточная модель с применением перистальтического насоса Microperplex 2132-001 (Pharmacia LKB, Швеция). На

чашке Петри выращивался монослой EA.hy926 согласно разделу 2.2.2, после чего в чашку вносился прямоугольный полистироловый вкладыш с трубками с двух сторон. Со стороны приточной трубки помещался контейнер с хемоаттрактантом. Со стороны вытяжной трубки в камеру помещались нейтрофилы, которые должны были преодолевать противоток жидкости для миграции к контейнеру с хемоаттрактантом. Перистальтический насос в течение 30 минут создавал ток жидкости со скоростью 1 мл/ч, что соответствует скорости тока крови в капилляре. Затем ток жидкости ускорялся до 20 мл/ч, что соответствует скорости тока в венуле. Миграция нейтрофилов оптически регистрировалась с использованием микроскопа Микромед И (Наблюдательные приборы, Россия/КНР) через видеоокуляр TourCam UA1000CA (Tourtek, КНР). Схематично модель представлена на рисунке 7.

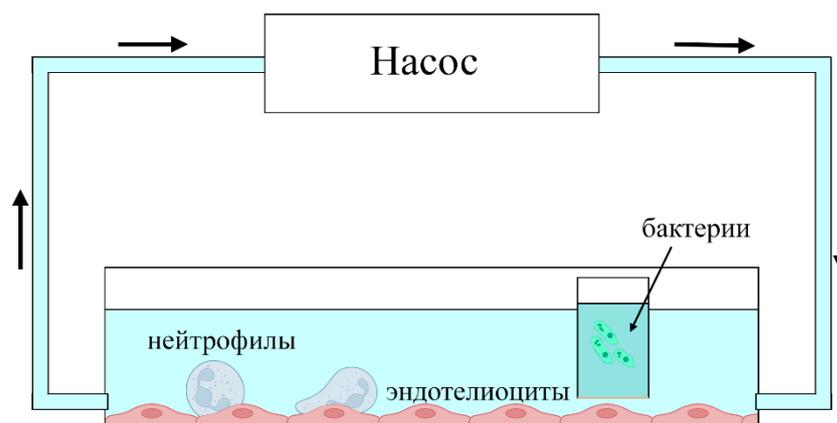


Рисунок 7 – Принципиальная схема проточной модели миграции нейтрофилов.

Нейтрофилы мигрируют против создаваемого насосом тока жидкости в замкнутом контуре, в сторону контейнера с хемоаттрактантом, закрепленного около нагнетательной трубки.

### 2.2.6 Эксперименты по определению активных форм кислорода и азота в клетках

Эксперименты по определению АФК в единичных клетках проводили по методике, разработанной Ваневым и соавторами [Ванев и др., 2018].

### 2.2.6.1 Подготовка и калибровка зондов

Платиновые нанозлектроды (PtNE) были изготовлены на основе коммерческих углеродных нанозлектродов (ICAPPIC Ltd., Великобритания) с диаметром кончика 50-150 нм после вытягивания на лазерном пуллере по методике, описанной в разделе 2.2.5.1. Электроды помещались в 1 мМ раствор ферроцен-метанола (Sigma, США) в ФСБ для оценки размера электрохимической поверхности. Нанополости на углеродном электроде использовались для улучшения адгезии платины, для чего проводилось травление в 0,1 М растворе КОН и 10 мМ КСl (оба – Векос, Нижний Новгород) в течение 40 десятисекундных циклов. Затем на углеродную поверхность нанозлектрода электрохимически осаждалась платина для повышения его электрохимической активности путем изменения потенциала с 0 до +2200 мВ в течение четырех-пяти циклов в 2 мМ растворе  $\text{H}_2\text{PtCl}_6$  в 0,1 М соляной кислоте.

Для каждого платинированного нанозлектрода была построена калибровочная зависимость с использованием серии стандартных растворов  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{NO}_2^-$  при потенциале +800 мВ с концентрацией от  $10^{-7}$  до  $10^{-4}$  М. Результаты представлены на рисунке 8.

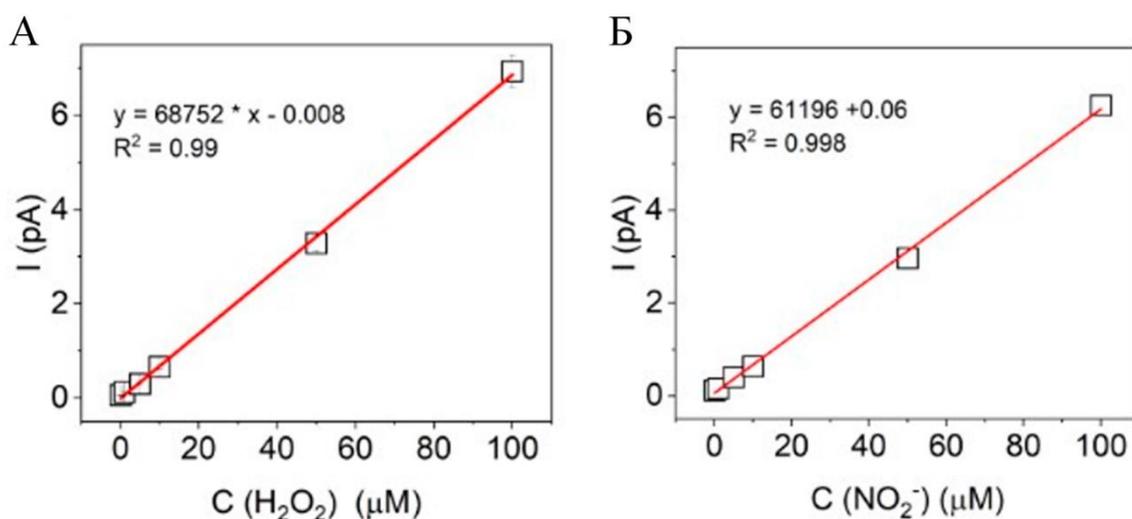


Рисунок 8 – Градуировочная зависимость изготовленных нанозлектродов по пероксиду водорода (А) и по нитриту натрия (Б).

### **2.2.6.2 Определение продукции АФК в нейтрофилах при стимуляции бактериальными штаммами**

Все электрохимические измерения проводились с использованием двухэлектродной установки. Электродом сравнения служил хлорсеребряный электрод, а именно, серебряная проволока диаметром 0,3 мм, покрытая слоем AgCl. Все потенциалы приведены относительно электрода сравнения Ag/AgCl. Фарадеевский ток измерялся с помощью усилителя MultiClamp 700B (MolecularDevices, США). Данные обрабатывались с помощью АЦП-ЦАП AxonDigidata 1440B и программного обеспечения pClamp 10 (Molecular Devices, США). Микроманипулятор PatchStar (Scientifica, Великобритания) использовался для позиционирования электрода. Оптический контроль осуществлялся с помощью микроскопа (Nikon, Япония). Сигналы фильтровались низкочастотными фильтрами с частотой 0,5 кГц. Внутриклеточная продукция АФК измерялась при постоянном потенциале +800 мВ относительно Ag/AgCl электродов. Спонтанная адгезия суспензии нейтрофилов (конечная концентрация  $10^6$  клеток/мл) в стерильной 35 мм чашке Петри с адгезионным покрытием достигалась инкубацией (37 °С, 20 мин). Затем в нейтрофил вводился наноэлектрод и происходила регистрация продукции АФК. Затем к нейтрофилам в чашке добавлялась бактериальная суспензия (*S.aureus* 2879М или *E.coli* 321) в концентрации MOI 50 и регистрировался мгновенный ответ клетки.

Записанные хроноамперограммы подвергались дальнейшей обработке: рассчитывалась площадь под кривой каждого пика, которая соответствовала заряду в кулонах.

### **2.2.6.3 Определение активных форм кислорода и азота в эндотелиальных клетках при взаимодействии с бактериальными штаммами и нейтрофилами**

Для определения АФК и активных форм азота АФА в клетках EA.hy926 использовалась методика, описанная в разделе 2.2.6.2.

Измерения проводились на клетках монослоя EA.hy926, выращенных в чашке Петри согласно методике в разделе 2.2.2, в следующих системах: (1)

измерение базового уровня продукции АФК/АФА контрольными неактивированными эндотелиальными клетками; (2) оценка уровня АФК/АФА, соответствующего нормальному физиологическому состоянию в кровеносных сосудах (когда эндотелиальные клетки и нейтрофилы не были праймированы, и происходили их спонтанные контакты); (3) измерение уровня АФК/АФА в эндотелиальных клетках после моделирования бактериемии, вызванной *S.aureus* 2879М и *E.coli* 321 (МОИ 10), с последующим добавлением нейтрофилов – аналог клинического состояния, когда нейтрофилы переходят в маргинальный пул сосудов после инвазии патогена; (4) измерение уровня АФК/АФА в эндотелиальных клетках после внесения к ним праймированных нейтрофилов (которые были предварительно проинкубированы с *S.aureus* 2879М и *E.coli* 321 в концентрации МОИ 10, 37 °С, 30 мин, а затем отмыты от бактерий дважды (400 g, 5 мин)).

Для корректного подсчета МОИ, количество эндотелиальных клеток, выросших на чашке Петри, оценивалось с помощью проточной цитофлуориметрии с одновременным анализом жизнеспособности клеток. Аналогичный эксперимент проводили после воздействия *S.aureus* 2879М (МОИ 10, 60 мин) для контроля воздействия бактерий на эндотелиальные клетки. Количество эндотелиоцитов на чашке и их жизнеспособность определялось методом проточной цитофлуориметрии аналогично протоколу, описанному в разделе 2.2.5.1. Расчетное количество эндотелиальных клеток в чашке Петри в начале эксперимента составляло около  $1,2 \times 10^6$ , а уровень жизнеспособности –  $97,40 \pm 1,74$  %. После воздействия *S.aureus* 2879 М уровень жизнеспособности статистически значимо не снижался и оставался на уровне  $95,70 \pm 0,90$  %. Примеры полученных распределений представлены на рисунке 9.

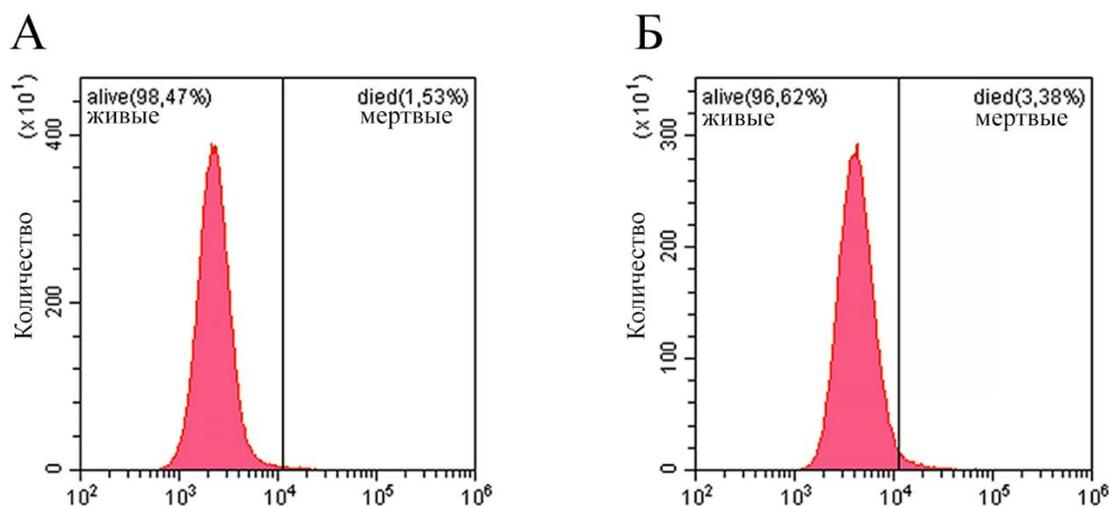


Рисунок 9 – Жизнеспособность клеток линии EA.hy926, определенная методом проточной цитофлуориметрии: (А) – в контрольной чашке Петри; (Б) – после часовой инкубации с MOI 10 *S.aureus* 2879M.

#### 2.2.6.4 Определение продукции АФК нейтрофилами в момент адгезионного взаимодействия с эндотелиальным монослоем

Для определения уровня АФК использовалась методика, описанная в разделе 2.2.6.2. Чтобы избежать предварительной активации нейтрофилов при контакте с эндотелием, была разработана следующая методика. С чашки Петри с выращенным монослоем EA.hy926 стерильным скребком для клеток механически счищалась половина монослоя, после чего на освободившуюся поверхность вносились непраймированные нейтрофилы (контроль) (рис. 10 А). Нейтрофил пронзался наноэлектродом, поднимался с поверхности чашки Петри микроманипулятором, переносился к эндотелиальной клетке и прижимался к ней, моделируя адгезионный контакт (рис. 10 Б, В). В процессе эксперимента непрерывно производилась регистрация продукции АФК нейтрофилом. В опытных экспериментах перед внесением в чашку нейтрофилы предварительно инкубировались с MOI 10 *S.aureus* 2879M или *E.coli* 321 (37 °C, 30 мин, двухкратное встряхивание), после чего дважды отмывались СФР (400 g, 5 мин). Праймированные нейтрофилы вносились в чашку Петри аналогично контрольным.

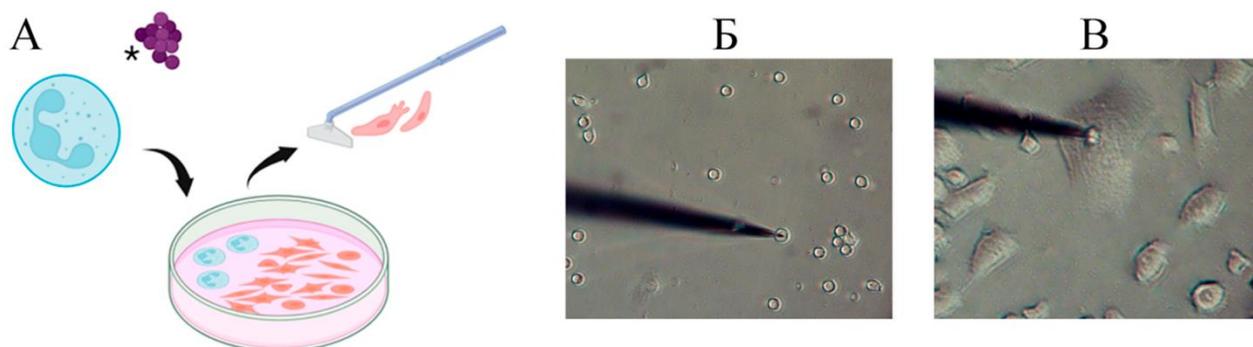


Рисунок 10 – (А) – принципиальная схема эксперимента: часть эндотелия механически счищается, после чего заменяется на нейтрофилы; (Б-В) – процесс забора нейтрофила нанозлектродом, его перенос к эндотелиальной клетке и прижатие с непрерывающим определением продукции АФК клеткой на протяжении всего процесса.

### 2.2.7 Определение продукции активных форм кислорода популяцией нейтрофилов

Для определения продукции АФК в популяции нейтрофилов проводилось окрашивание нейтрофилов красителем 6-Карбокси-Н<sub>2</sub>DCFDA аналогично разделу 2.2.5.2. Для сравнительной продукции АФК эндотелиальные клетки EA.hy926 выращивались на 96-луночном планшете согласно разделу 2.2.2, после чего в каждую лунку вносилось  $2 \times 10^5$  клеток/мл суспензии нейтрофилов (количество клеток пересчитывалось от площади лунки чтобы соответствовать соотношению эндотелиоцитов и нейтрофилов в миграционных экспериментах), куда помещался контейнер с хемоаттрактантом аналогично разделу 2.2.5.2. Продукция АФК анализировалась на микропланшетном спектрофотометре BioTekPowerWave HT (BioTek, США) дискретно каждые 10 мин в течение 1 ч.

### 2.2.8 Определение энергетического потенциала мигрирующих нейтрофилах по содержанию гликогена в клетке

Для определения расхода энергии на миграционные процессы использовалась горизонтальная модель, описанная в разделе 2.2.5.2. После проведения экспериментов нейтрофилы фиксировались 99 % метанолом (Sigma, США) (30 с), отмывались проточной водой от избытка растворителя и

проводилось определение гликогена в клетках [McManus, 1948] с помощью коммерческого набора (НПФ Абрис+, Санкт-Петербург).

Для этого фиксированные препараты в темноте 20 минут обрабатывались 0,01 М раствором йодной кислоты, ополаскивались дистиллированной водой, промокались фильтровальной бумагой и на 1 час помещались в реактив Шиффа комнатной температуры. Окрашенные препараты 5 минут промывались проточной дистиллированной водой, после чего ядра докрашивались гематоксилином Майера 15 минут с 10 секундной отмывкой. Препараты высушивались на воздухе в темноте, после чего микроскопировались с иммерсией (Микромед И, Наблюдательные приборы, Москва/КНР).

По результатам окрашивания подсчитывали средний цитохимический коэффициент (СЦК) по формуле 2.

$$\text{СЦК} = \frac{3 \times C + 2 \times B + A}{100}, \quad (2)$$

где А – количество клеток со слабо-диффузным окрашиванием или единичными гранулами в цитоплазме: 1 балл;

В – количество клеток с диффузным окрашиванием цитоплазмы, наличием умеренного числа гранул: 2 балла;

С – количество клеток с интенсивным окрашиванием цитоплазмы, гранулы заполняют клетку: 3 балла.

### 2.2.9 Статистический анализ

Статистическая обработка численных результатов проводилась в программе Origin Pro 2021b (Origin Lab, США). Критерий Шапиро-Уилка использовался для определения нормальности распределения. При нормальном распределении использовался t-критерий Уэлча (t-test) и ANOVA. Если распределение отличалось от нормального использовался U-критерий Манна-Уитни (U-test). Различия между выборками признавались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1 Характер трансэндотелиальной миграции нейтрофилов в вертикальной модели

##### 3.1.1 Особенности миграции нейтрофилов через эндотелиальный монослой в вертикальной модели исследования трансэндотелиальной миграции

Трансэндотелиальная миграция нейтрофилов протекает главным образом в посткапиллярных венулах [Xia et al., 2024]. Они характеризуются однослойным эндотелиальным покрытием [Niethamer et al., 2020], поэтому важно было получить монослой культуры EA.hy926. Оптимальными условиями формирования монослоя были начальная концентрация клеток культуры  $2,5 \times 10^5$  клеток/мл и время инкубации в диапазоне 48-72 ч. Монослой эндотелиальных клеток, выращенный на мембране культурального вкладыша, проанализированный методами оптической световой микроскопии и сканирующей ион-проводящей микроскопии представлен на рисунке 11.

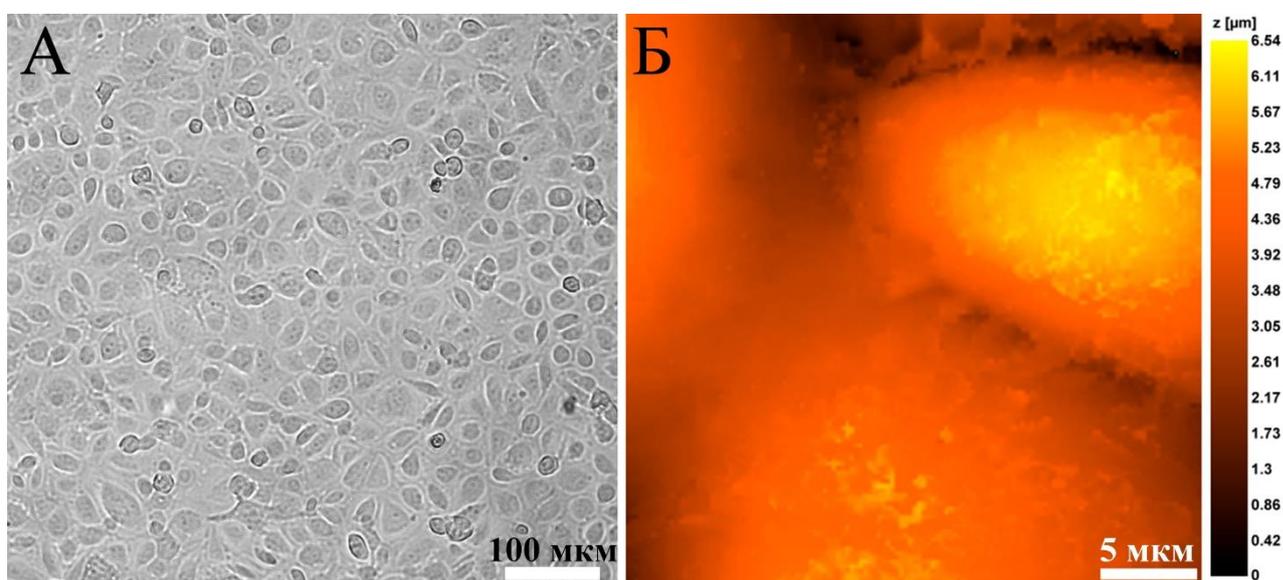


Рисунок 11 – Монослой клеток EA.hy926 на поликарбонатной мембране с диаметром пор 3 мкм. (А) – световая микроскопия; (Б) – сканирующая ион-проводящая микроскопия.

Прохождение нейтрофилов через смоделированный барьер из верхней камеры в нижнюю было доказано методами проточной цитофлуориметрии и флуоресцентной микроскопии. Нейтрофилы, адгезировавшие к поверхности нижней камеры после миграции обнаруживались преимущественно в экспериментах с бактериальным аттрактантом.

За время эксперимента (2 часа) лишь незначительное количество нейтрофилов плотно адгезировалось на дне камеры, остальные клетки оставались в суспензии или легко смывались с поверхности пластика. На рисунке 12 представлены результаты проточной цитофлуориметрии. Порядка 60 % нейтрофилов, мигрировавших через эндотелиальный монослой в нижнюю камеру во время эксперимента, сохраняли свою жизнеспособность в контроле, с незначительными тенденциями к снижению жизнеспособности в присутствии бактериального аттрактанта. Незначительный процент погибших нейтрофилов может быть объяснен сравнительно низкой концентрацией бактерий в нижней камере (MOI 10), в то время как нормально функционирующий нейтрофил способен поглощать вплоть до 50 бактериальных клеток (MOI 50), сохраняя жизнеспособность [van Kessel et al., 2014]. Практически все погибшие нейтрофилы (30% от всех мигрировавших) погибали по механизму некроза, то есть реализовывали провоспалительный потенциал после прохождения эндотелиального барьера.

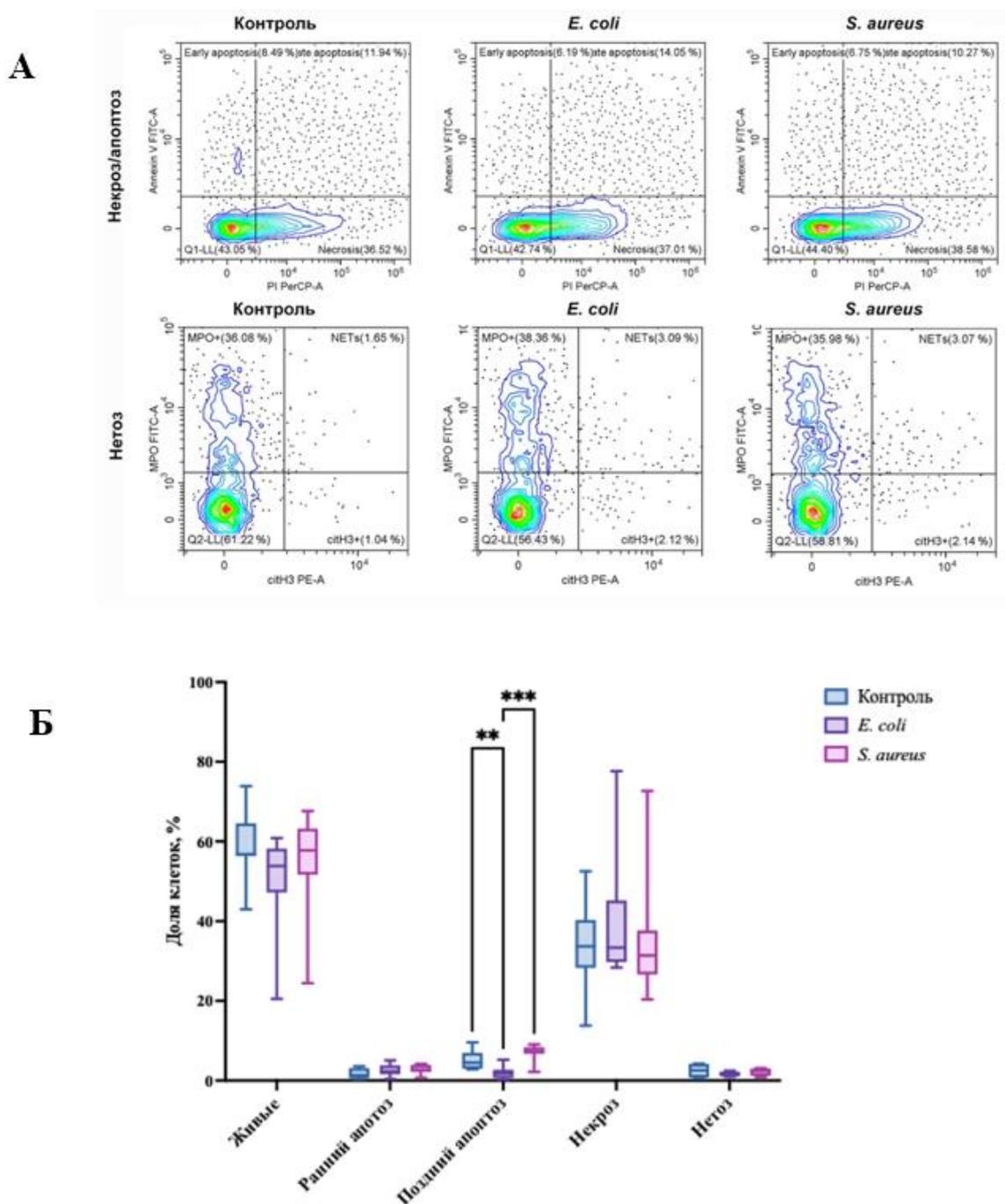


Рисунок 12 – (А) – репрезентативные диаграммы проточной цитофлуориметрии мигрировавших нейтрофилов; (Б) – распределение не адгезировавших мигрировавших в нижнюю камеру нейтрофилов по характеру клеточной гибели. (различия статистически значимы \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$ ; критерий ANOVA;  $n = 5$ ).

На рисунке 13 представлены адгезировавшие нейтрофилы в состоянии апоптоза, некроза (в экспериментах, где в качестве аттрактанта использовалась *E.coli* 321, рис. 13 А, Б) или быстрого и классического нетоза [Плескова и др., 2019] (в экспериментах с использованием *S.aureus* 2879М, рис 13 В, Г).

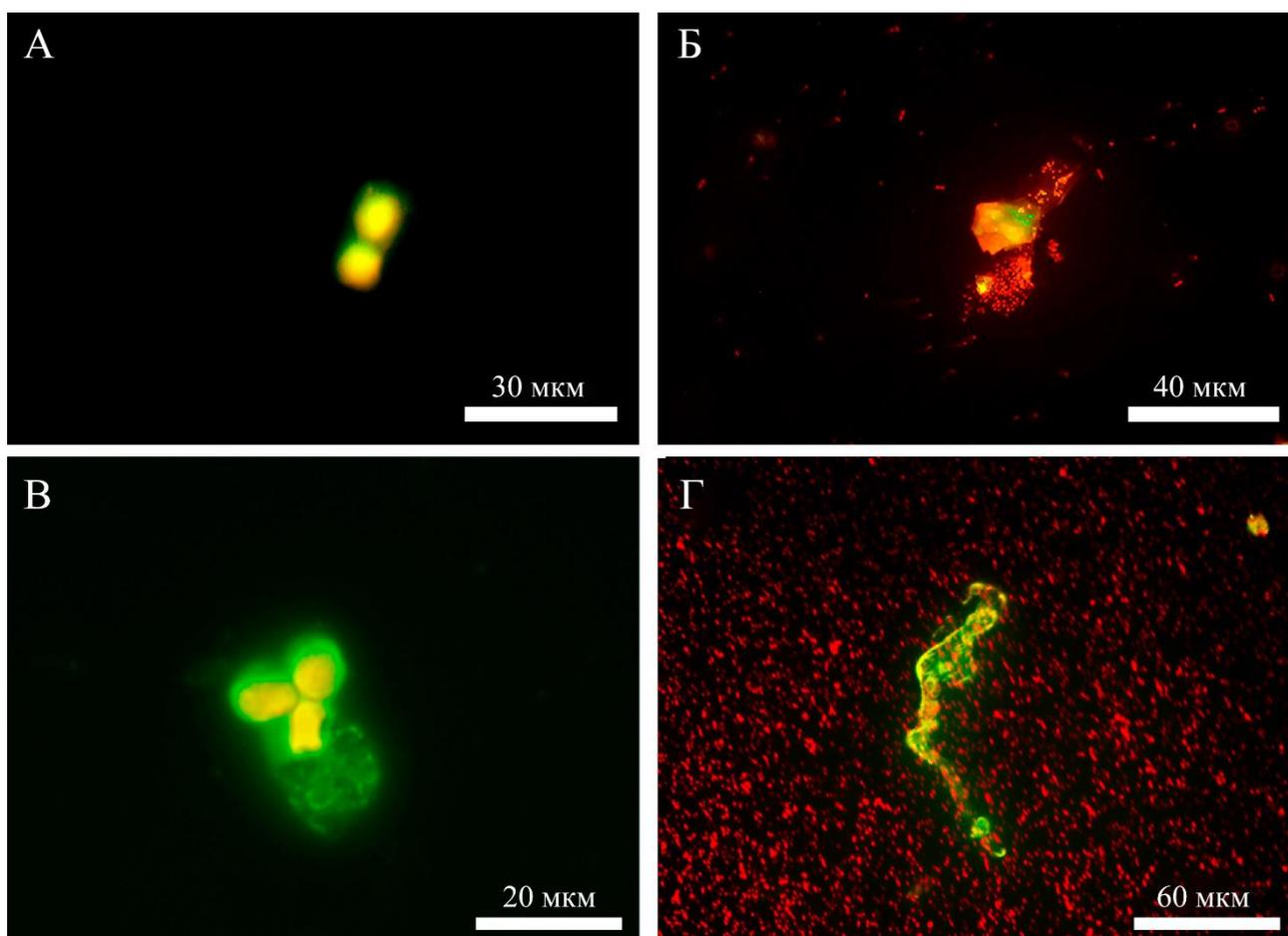


Рисунок 13 – Нейтрофилы после прохождения эндотелиального барьера и адгезии на дне нижней камеры. Флуоресцентная микроскопия. Зеленый – МПО, красный – PI, желтый – наложение. Верхний ряд – использование в качестве хемоаттрактанта MOI 10 *E.coli* 321. (А) – апоптоз; (Б) – некроз. Нижний ряд – использование в качестве хемоаттрактанта MOI 10 *S.aureus* 2879М. (В) – быстрый нетоз, характеризующийся сохранением жизнеспособности нейтрофила и выбросом только части клеточного материала; (Г) классический нетоз, выброс ДНК на расстояние порядка 100 мкм.

### 3.1.2 Характер трансэндотелиальной миграции нейтрофилов, исследованный высокоразрешающим методом СИПМ

Наблюдения за эндотелиальным монослоем начинали до внесения нейтрофилов в систему (контрольный снимок). После внесения нейтрофилов в верхнюю камеру (рис. 14 А), в монослое образовывались просветы для миграции (рис. 14 Б-Г) иногда еще до оседания первых нейтрофилов. Достигая поверхности эндотелиального слоя, нейтрофилы сразу двигались к просветам (рисунок 14 Д) и мигрировали парацеллюлярно. Клетки образовывали крупные

зоны миграции в местах образования просветов (рисунок 14 Й-О) и двигались по пути наименьшего сопротивления, не создавая новых областей миграции. Такое поведение нейтрофилов было универсальным вне зависимости от использованного бактериального хемоаттрактанта: *E.coli* (рис. 15 А), *P.mirabilis* (рис. 15 Б), *E.faecalis* (рис. 15 В), *S.aureus* (рис. 14, рис. 16).

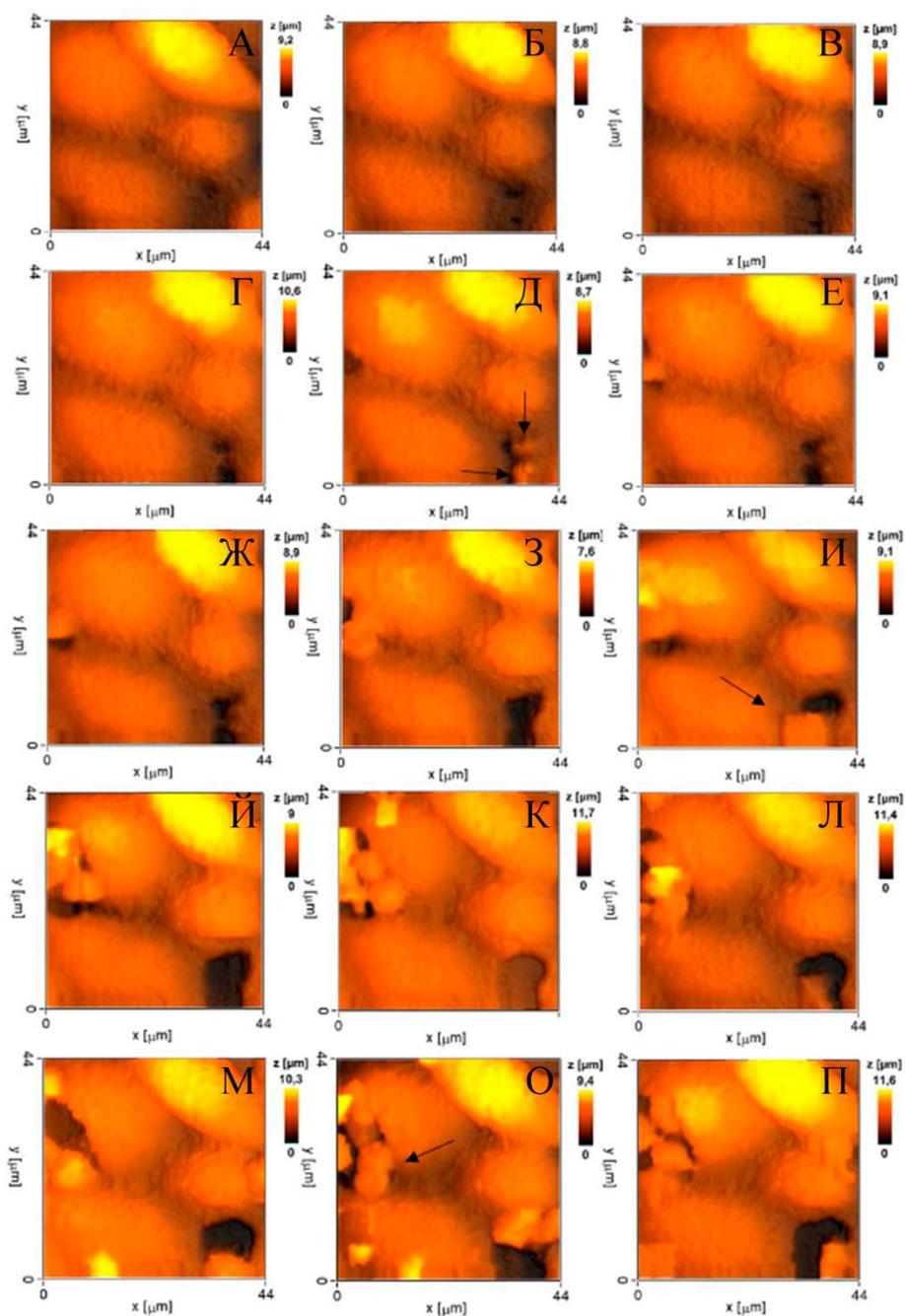


Рисунок 14 – Миграция нейтрофилов через эндотелиальный слой по градиенту аттракции, созданному *S.aureus* 2879M. (А) – контрольный снимок монослоя; (Б-Г) – сканирование до оседания клеток; (Д-О) – визуализация миграции. Интервал между кадрами – 3 минуты.

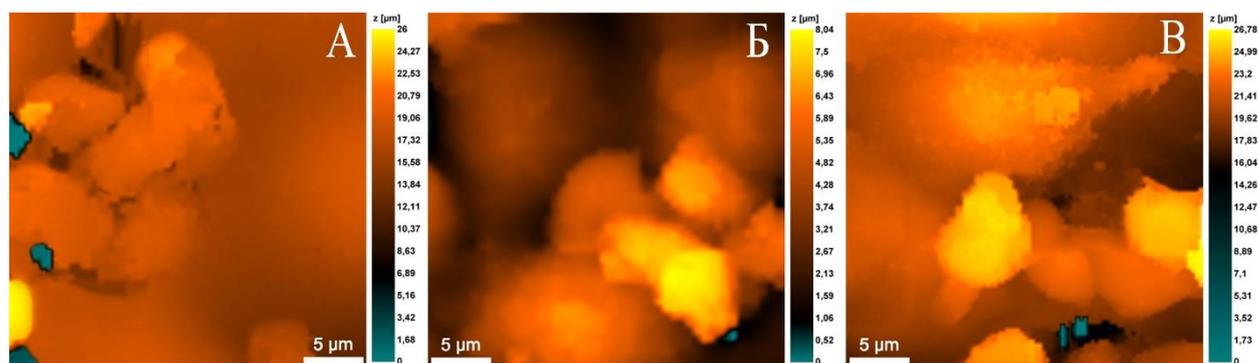


Рисунок 15 – Роение нейтрофилов при миграции через эндотелиальный слой по градиенту аттракции, созданному: (А) – *E.coli* 321, (Б) – *P.mirabilis* 649-2, (В) – *E.faecalis* 645-p2.

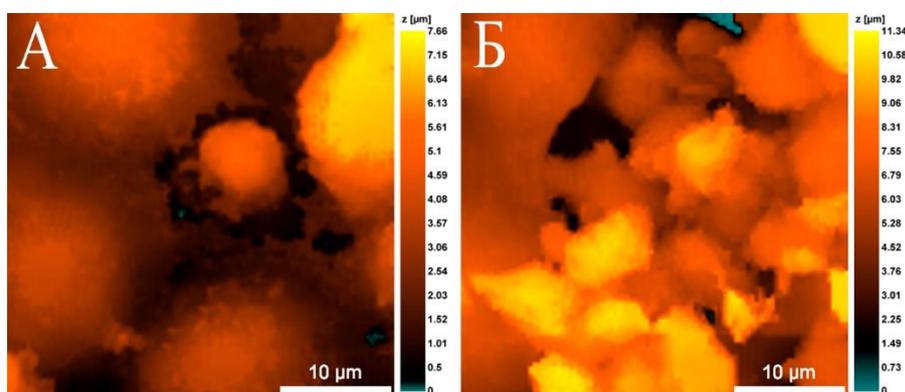


Рисунок 16 – Миграция нейтрофилов по градиенту, создаваемому *S.aureus* 2879M. (А) – первичное образование просвета одним нейтрофилом; (Б) – массовая миграция клеток через просвет спустя 12 минут.

Роение нейтрофилов – давно наблюдаемый, но 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; Brown and Yip, 2023]. В процессе миграции роение может быть обусловлено несколькими факторами. Во-первых, образование крупного просвета естественным образом локально увеличивает концентрацию хемоаттрактанта, из-за чего происходит активное привлечение все новых и новых нейтрофилов к единой зоне миграции. Во-вторых, в процессе аттракции и миграции нейтрофилов активируются механизмы взаимного общения между

нейтрофилами (чувство кворума – *sententia quorum*), при котором высвобождение хемокинов и АФК одними нейтрофилами способно мобилизовывать дополнительные клетки [Metzemaekers et al., 2020]. В-третьих, увеличение потока мигрирующих нейтрофилов через крупный просвет может помочь не допустить выход патогена в сосудистое русло [Kienle et al., 2021].

Динамика морфо-механических изменений в исследуемой системе представлена на рис. 17. Модуль Юнга эндотелиоцитов, по поверхности которых осуществлялась миграция нейтрофилов, варьировал в диапазоне от 600 до 1500 Па. Наименьшие значения модуля Юнга регистрировались на периферических участках клеток, где преимущественно и происходила парацеллюлярная миграция. Меньший модуль Юнга периферии эндотелиоцита, предположительно, также способствовал парацеллюлярной миграции нейтрофилов, как и меньшая плотность монослоя. Модуль Юнга нейтрофилов был значительно ниже и составлял 600 Па в покое и 300-400 Па непосредственно при трансэндотелиальной миграции, 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* 2879М [Pleskova et al., 2020].

При отсутствии в непосредственной близости межэндотелиальных просветов, нейтрофилы направленно мигрировали к уже сформированным просветам, расположенным на расстоянии, избегая образования новых или трансцеллюлярного диапедеза (рис. 18). Перемещение осуществлялось за счёт формирования ламеллоподий. Движение по поверхности эндотелия осуществлялось со средней скоростью около 2 мкм/мин на основании нескольких зарегистрированных нейтрофилов.

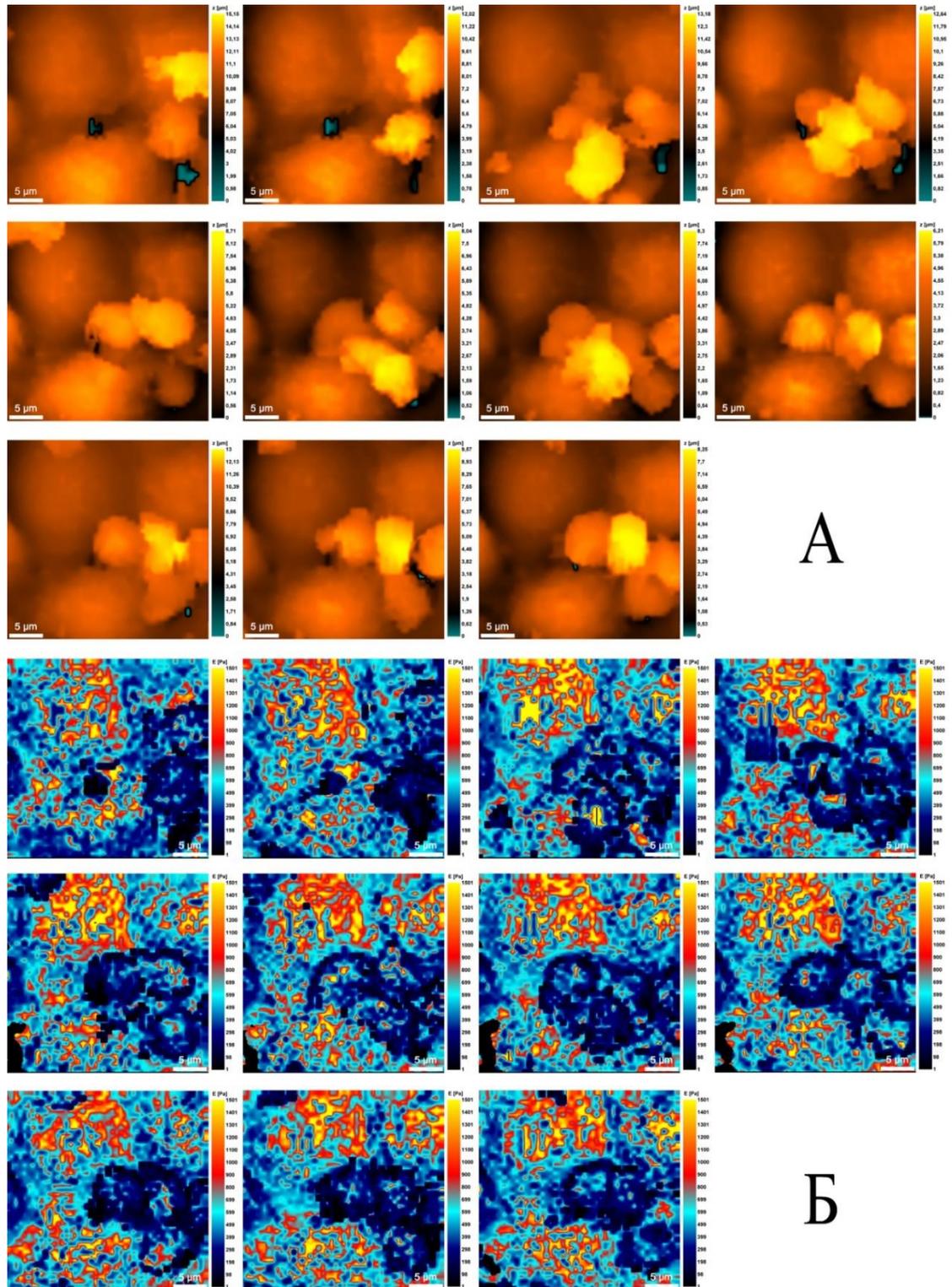


Рисунок 17 – Динамика миграции нейтрофилов через просвет в эндотелиальном слое по градиенту *P.mirabilis* 649-2. (А) – топография области. Нейтрофилы роятся для миграции через созданный просвет; (Б) – модуль Юнга исследуемой области. Мигрирующие нейтрофилы имеют модуль Юнга в диапазоне 300-600 Па, у непосредственно мигрирующих трансэндотелиально клеток модуль Юнга приближался к нижней границе интервала. Интервал между кадрами – 2 мин.

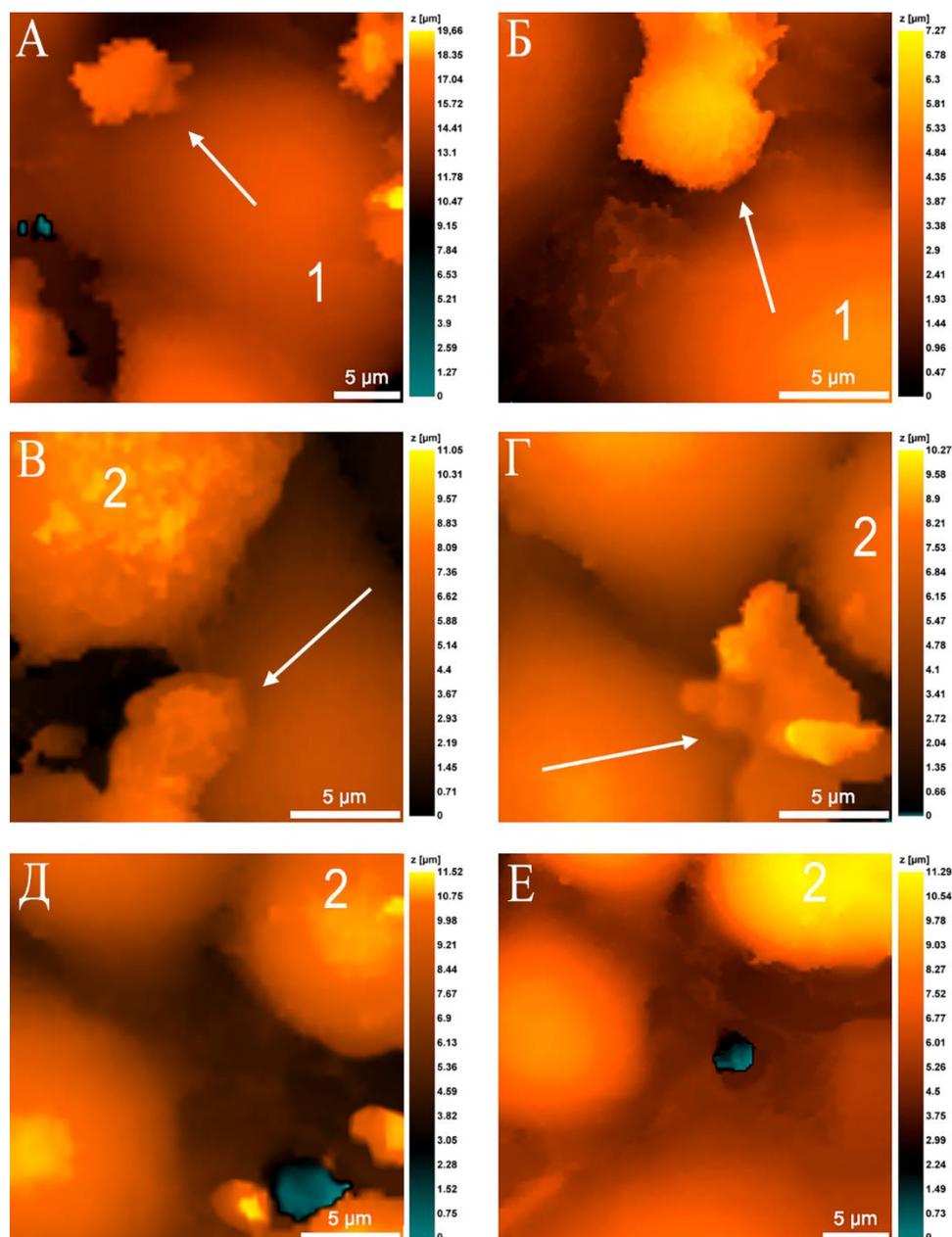


Рисунок 18 – Переползание (А-В) и последующая миграция (Г-Е) нейтрофила (помечен стрелкой) по градиенту хемоаттракции, созданному *S.aureus* 2879М.

В процессе переползания нейтрофил образовывал ламеллоподии. Интервал между кадрами – 4 мин.

Не все нейтрофилы в исследуемой системе демонстрировали способность к миграции. Часть клеток переходила в состояние анергии – функциональной невосприимчивости к стимулам, – оставаясь длительное время иммобилизованными. Подобное поведение наблюдалось при использовании различных бактериальных хемоаттрактантов, как грамотрицательных *E.coli* 321 (рис. 19 А-В) так и грамположительных *S.aureus* 2879М (рис. 19 Г).

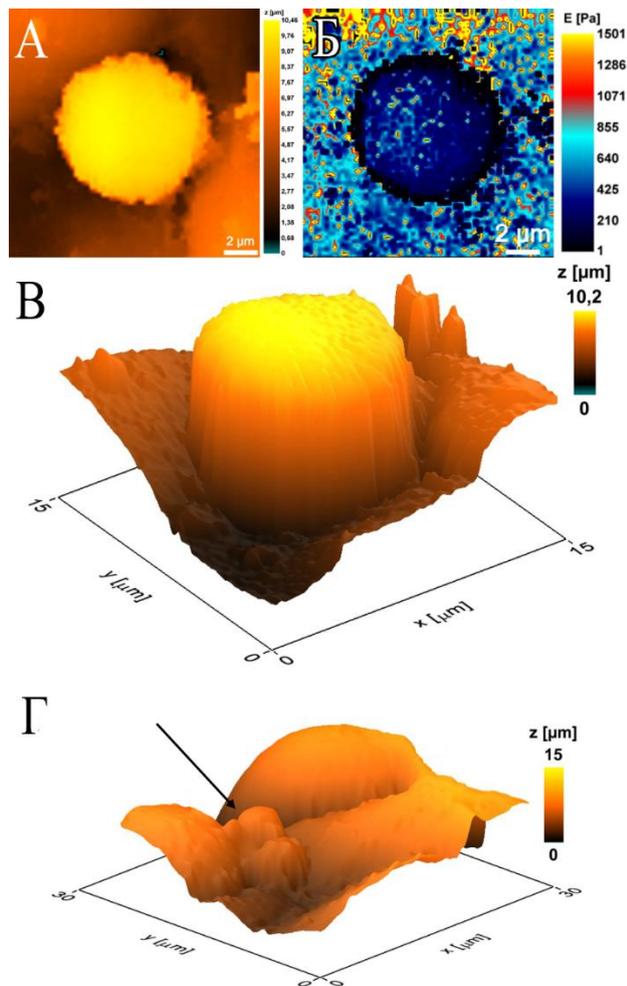


Рисунок 19 – Немигрирующие нейтрофилы в состоянии анергии. (А) – морфология покоящегося нейтрофила в системе с *E.coli* 321 в качестве хемоаттрактанта; (Б) – та же клетка, карта ригидности; (В) – та же клетка, трехмерное изображение; (Г) – два не мигрировавших нейтрофила (помечены стрелкой) в системе со *S.aureus* 2879М в качестве хемоаттрактанта, общий план.

Важно отметить, что анергичные нейтрофилы обладали характерной округлой морфологией, отличной от активно мигрирующих клеток. В ходе часового сканирования такие клетки оставались в одной области, не реагируя на внешние стимулы, что позволяет делать выводы об отсутствии потенций к трансцеллюлярной миграции, которая обычно протекает в течение нескольких минут после закрепления нейтрофила в богатой ICAM-1 и кавеолином области [Lerman and Kim, 2015]. Также переход в анергичное состояние может быть обусловлен неравномерным распределением пор в мембране и их перекрытием эндотелиальными клетками, что затрудняет диффузию хемоаттрактантов и, как

следствие, миграцию нейтрофилов в заданных областях. Все анергичные нейтрофилы регистрировались в областях, где отсутствовали другие нейтрофилы поблизости, таким образом покоящиеся клетки не могли быть активированы, например, посредством кросстолка (*crosstalk* – взаимное общение) между мигрирующими клетками, а также в этих областях, вероятно, не происходило явной активации эндотелия. Альтернативно, допуская контакт анергичных нейтрофилов с патогеном, анергию можно связать с нарушением секреции цитокинов в ответ на специфические антигены. Так продемонстрировано снижение функции  $T_{H1}$ -лимфоцитов у пациентов с перитонитом без компенсаторного увеличения продукции  $T_{H2}$ -цитокинов, что соответствует фенотипу анергии [Heidecke et al., 1999]. Дефект секреции цитокинов, однако, коррелирует с повышенной отложенной смертностью по механизму апоптоза [Brostjan and Oehler, 2020; Chen et al., 2025]. Апоптотическая гибель нейтрофилов, индуцированная сепсисом, может приводить к развитию анергии за счёт продукции противовоспалительных цитокинов, которые подавляют ответ на патогены. Ранее было показано, что при взаимодействии с *E.coli* 321 до 50% нейтрофилов погибают по механизму апоптоза [Pleskova et al., 2024]. Таким образом, возможно подавление функциональных свойств нейтрофилов факторами патогенности бактерий, что в конечном итоге приводит к нарушению диапедеза и отложенному апоптозу клетки.

В данном случае нейтрофилы не проявляли явных морфологических изменений, связанных с апоптотической гибелью, которые наблюдались в наших экспериментах ранее (рис. 20) и проходили значительно быстрее: от образования первых апоптотических телец до полной деструкции клетки проходило не более получаса. В то же время в экспериментах с анергичными нейтрофилами последние не меняли своей морфологии в течение 60 и более минут. Можно, однако, допустить подготовку данных клеток к гибели по более экзотическому механизму, например, мумификации [Плескова и др., 2019].

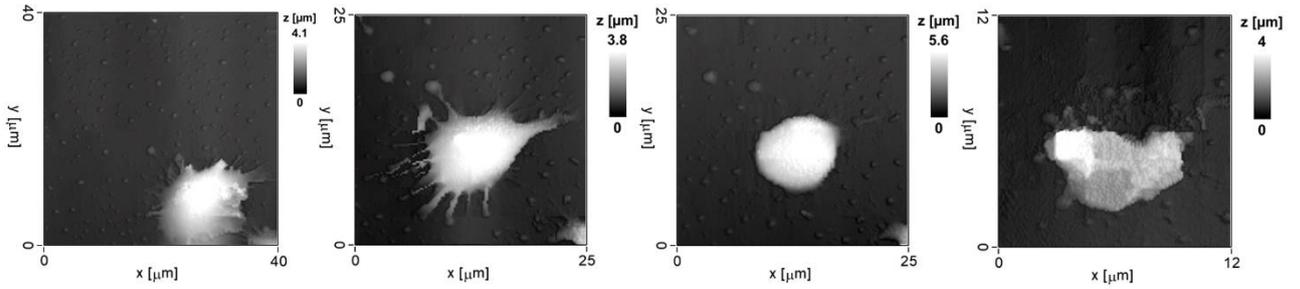


Рисунок 20 – Динамика апоптоза нейтрофила на поверхности чашки Петри, СИПМ. Интервал между кадрами – 6 минут.

Одним из важных аспектов миграции нейтрофилов в модели являлось их взаимодействие с фибриллярными структурами эндотелиальных клеток. Образование таких структур и их связывание с нейтрофилами представлено на рисунке 21.

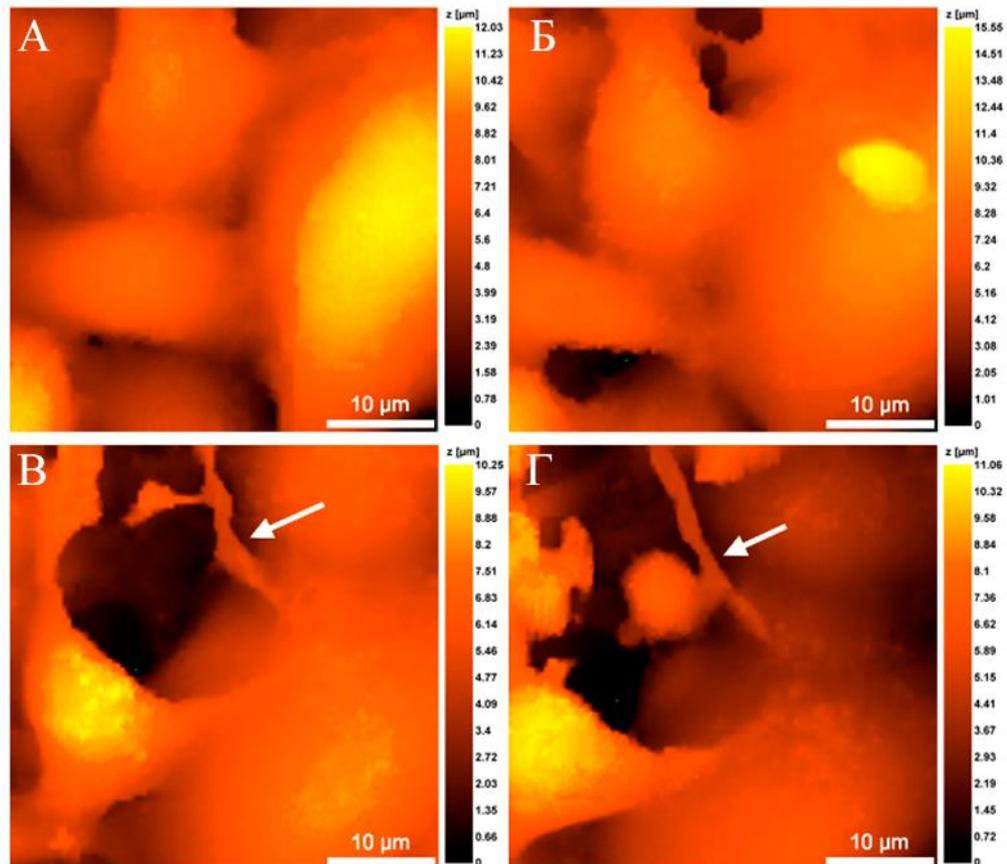


Рисунок 21 – Взаимодействие нейтрофилов с эндотелиальными фибриллами. (А) – изначальный монослой эндотелиоцитов; (Б) – изменение структуры монослоя через 48 минут; (В) – образование фибриллярных структур через 96 минут (указаны стрелкой); (Г) – связывание внесенного нейтрофила с фибриллой.

При рассмотрении таких взаимодействий с более высоким разрешением были обнаружены нитевидные структуры, связывающие нейтрофил с эндотелиальной фибрилой после попытки отделения от нее (рис. 22). Общее время наблюдения от начала сканирования до гибели и отрыва такой клетки составило 72 минуты. Предположительно, принимая во внимание гибель нейтрофила по окончании взаимодействия, данные нитевидные структуры могли являться нетотическими сетями. 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 в нижней камере, так и нейтрофилов в верхней.

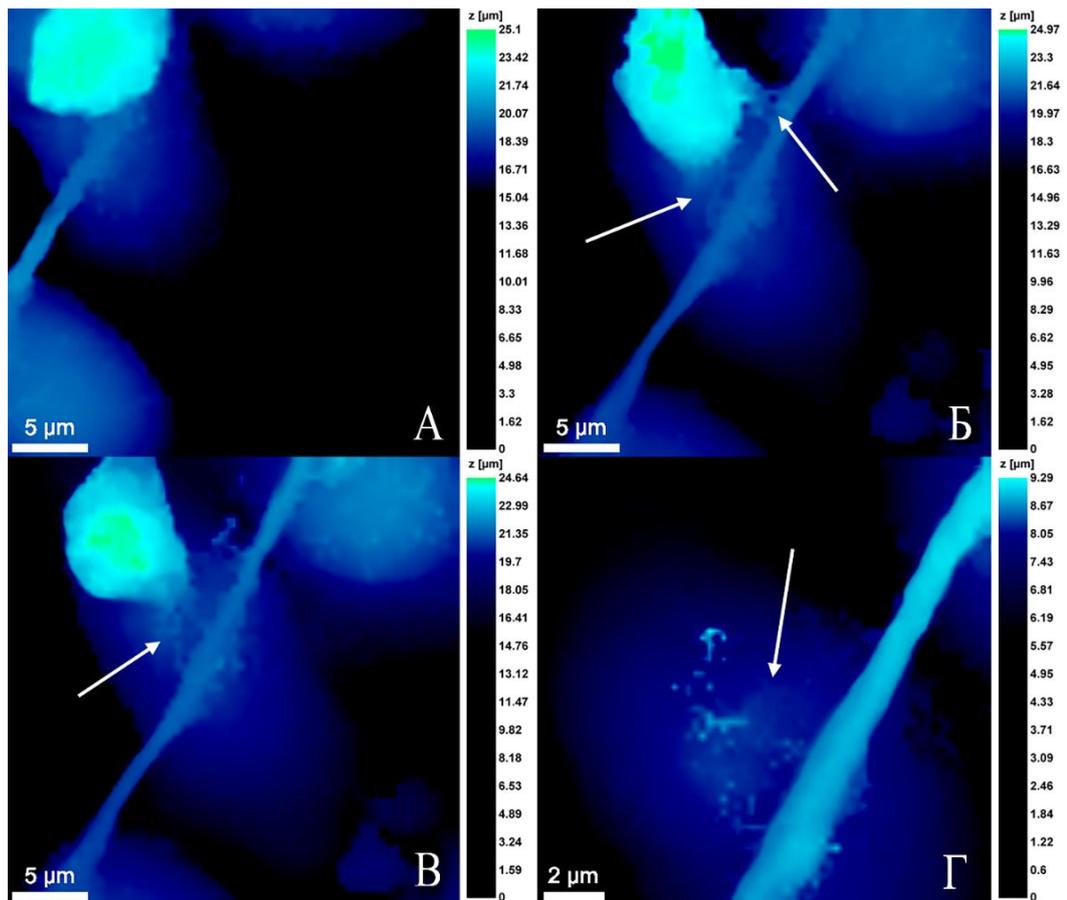


Рисунок 22 – Закрепление нейтрофила на фибрилле эндотелиоцита (А), попытка отделения, образование нетотических сетей (Б-В) и гибель (Г) в системе со *S.aureus* 2879М в качестве хемоаттрактанта. Стрелками помечены нетотические сети.

Таким образом, мигрирующие в модели нейтрофилы продемонстрировали большую функциональную гетерогенность. Большая часть клеток мигрировала парацеллюлярно, при этом подавляющее большинство сайтов миграции привлекало большое количество нейтрофилов и порождало роение. Единичные клетки как правило мигрировали в нижнюю камеру по уже проложенным маршрутам, перемещаясь на расстояния в десятки и сотни микрометров по направлению к очагу миграции. При отсутствии такового единичные клетки могли переходить в анергичное состояние, не подвергаясь диапедезу. Наконец, нейтрофилы демонстрировали ограниченную адгезию к эндотелию в модели, однако могли плотно связываться с эндотелиальными фибриллами, что провоцировало их дальнейшую активацию и гибель с образованием NETs, которые также наблюдались после миграции в нижнюю камеру.

### **3.1.3 Изменения эндотелиального монослоя в процессе миграции нейтрофилов**

Активация эндотелиального монослоя в процессе миграции сопровождалась его значительными преобразованиями. Клетки в общем случае сохраняли свой объем и механические свойства, но претерпевали существенные морфологические изменения. В таблице 2 представлены основные морфо-механические показатели эндотелиоцитов в монослое до и после миграции нейтрофилов через монослой. Изменение площади проекции клеток связано с нарушением межклеточных связей в монослое после миграции большого количества нейтрофилов через просвет.

Изменения могли быть как обратимыми, так и необратимыми. Например, в экспериментах со *S.aureus* было показано нарушение целостности мембраны с последующей полной регенерацией (рис. 22 А). В то же время при длительных наблюдениях (свыше 4 часов) иногда наблюдалась необратимая деградация мембраны, связанная с некротической гибелью клетки.

Таблица 2 – Морфометрические и вязко-упругие характеристики эндотелиальных клеток до и после миграции нейтрофилов в нижнюю камеру.

Характеристики	До миграции	После миграции
Площадь проекции клетки, мкм <sup>2</sup>	422,3 ± 116,7	354,6 ± 105,2*
Объем клетки, мкм <sup>3</sup>	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;  $n = 20$ .

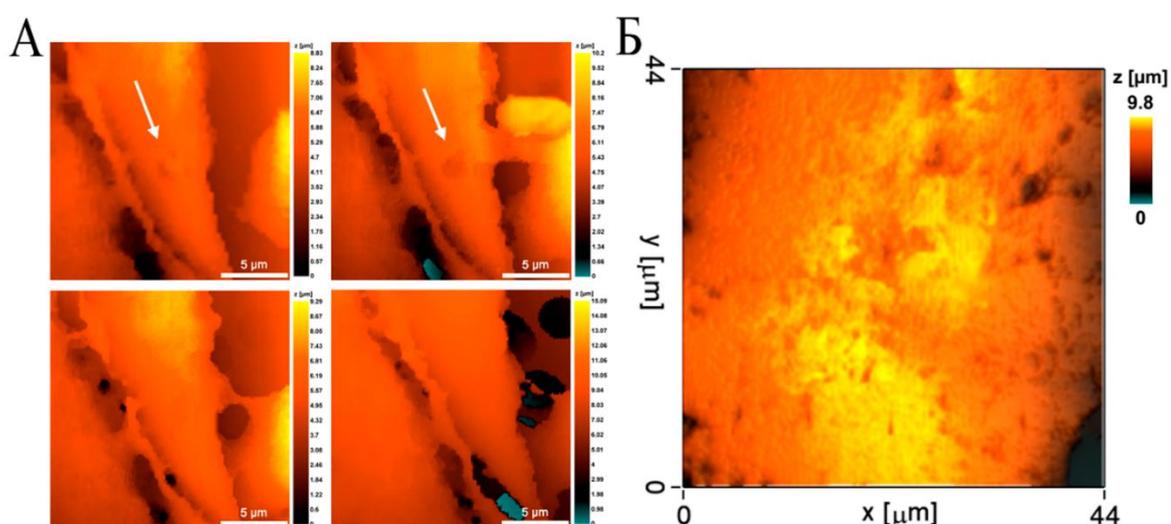


Рисунок 23 – Изменения морфологии эндотелиальных клеток в процессе миграции нейтрофилов по градиенту *S.aureus* 2879M. (А) – нарушение целостности мембраны (отмечена стрелкой) с последующей регенерацией. Время кадра 3 мин; (Б) – поверхность эндотелиоцита спустя 4 часа после начала сканирования.

Критическим фактором стабильности монослоя помимо времени являлся также бактериальный хемоаттрактант. Штаммы *S.aureus* 2879M, *E.coli* 321, *P.mirabilis* 649-2 в нижней камере приблизительно одинаково влияли на изменения эндотелиального монослоя, провоцируя его деградацию на длинной дистанции. 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 (рис. 24 А), в том числе сохранялись все микроструктуры на поверхности эндотелиоцитов. Несмотря на то, что

распределение значений модуля Юнга для данной области незначительно изменялось (рис. 24 Б), среднее значение для области оставалось стабильным (рис. 24 В).

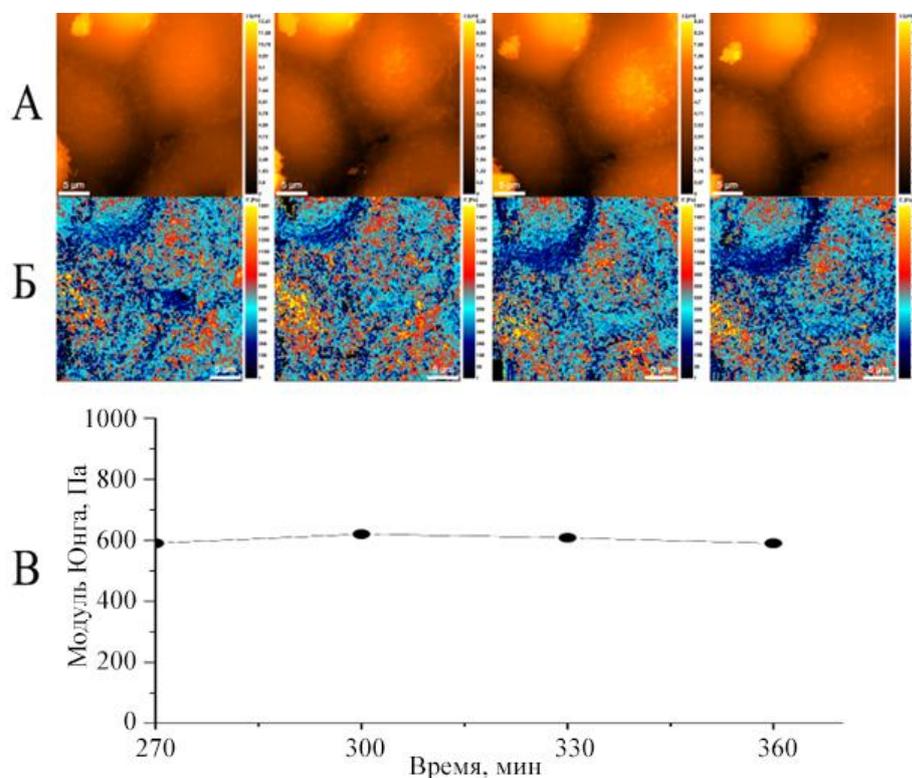


Рисунок 24 – Динамика состояния эндотелиоцитов в модели миграции с *E.faecalis* 645-p2 в качестве аттрактанта. Временной интервал наблюдения составлял от 270 мин (первое изображение) до 360 мин (последнее изображение) с момента начала сканирования; шаг между последовательными изображениями – 30 мин. (А) – морфология монослоя: хорошо визуализируются микроструктуры; (Б) – распределение модуля Юнга монослоя; (В) – динамика изменения среднего значения модуля Юнга в области сканирования.

### 3.1.4 Обратная миграция нейтрофилов

В случае гибели эндотелиальной клетки с течением времени (наблюдалось, как правило, после 5-6 часов совместного нахождения со *S.aureus* 2879M), погибшая клетка деадгезировалась с поверхности мембраны, открывая большое количество пор для наблюдения. Через данные поры мигрировавшие в нижнюю камеру нейтрофилы могли выходить обратно в верхний отсек с сохранением

подвижности (рис. 25) и образованием нейтрофилом псевдоподий, помогающих перемещаться против гравитации и хемотаксического градиента [Filippi, 2019].

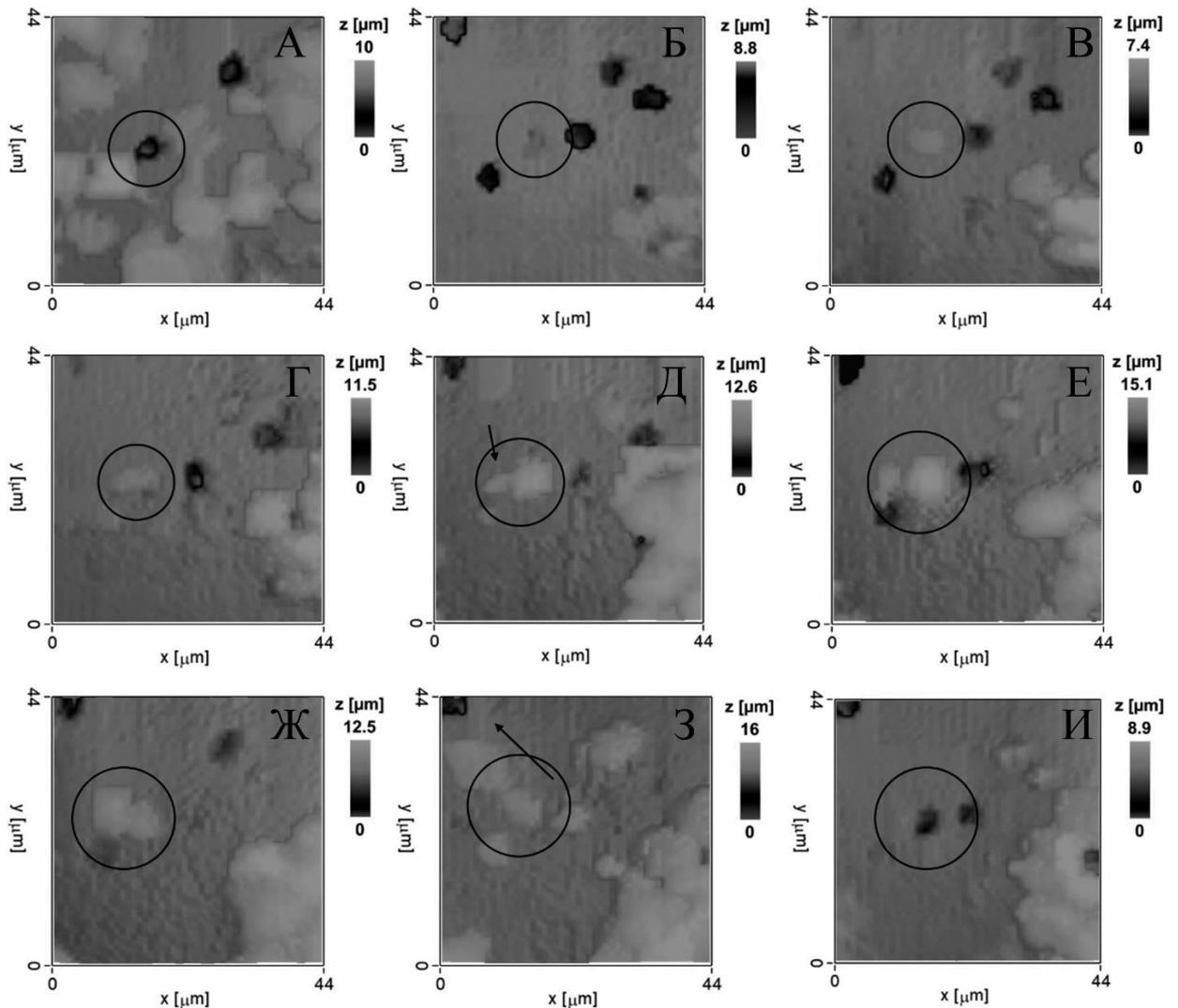


Рисунок 25 – Обратная миграция нейтрофила. (А) – изначальное поле, с внесенными нейтрофилами; (Б-Г) – выделенная пора перекрывается клеткой с обратной стороны; (Д-Е) – образование псевдоподии нейтрофилом для облегчения обратной миграции (указана стрелкой); (Ж-З) – завершение обратной миграции (стрелкой 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. Предположительно, обратно-мигрирующие нейтрофилы выполняют преимущественно сигнальную функцию либо представляют собой выжившие клетки, покидающие очаг воспаления на его

завершающих этапах [Xu et al., 2022]. Они способны к обратной миграции лишь из зон, непосредственно прилежащих к сосуду. В таких областях они могут получать молекулярные сигналы, индуцирующие обратную миграцию, от клеток, локализованных в самом очаге воспаления.

### 3.1.5 Исследование нейтрофилов после миграции в нижнюю камеру методом СИПМ

Поскольку конструкция двухкамерной модели позволяла анализировать не только клетки, оставшиеся в верхнем отсеке, но и мигрировавшие в нижний отсек нейтрофилы, по завершении экспериментов производилось извлечение вкладыша с последующим исследованием дна чашки Петри. Установлено, что большинство клеток (рис. 26 А) подвергалось полному лизису, в результате чего визуализировался лишь клеточный дебрис, что было показано методом флуоресцентной микроскопии. Вместе с тем, в эксперименте с использованием *S.aureus* 2879М в нижнем отсеке была зафиксирована структура, соответствующая NETs (рис. 26 Б), аналогично определявшимся в предварительных экспериментах методом флуоресцентной микроскопии.

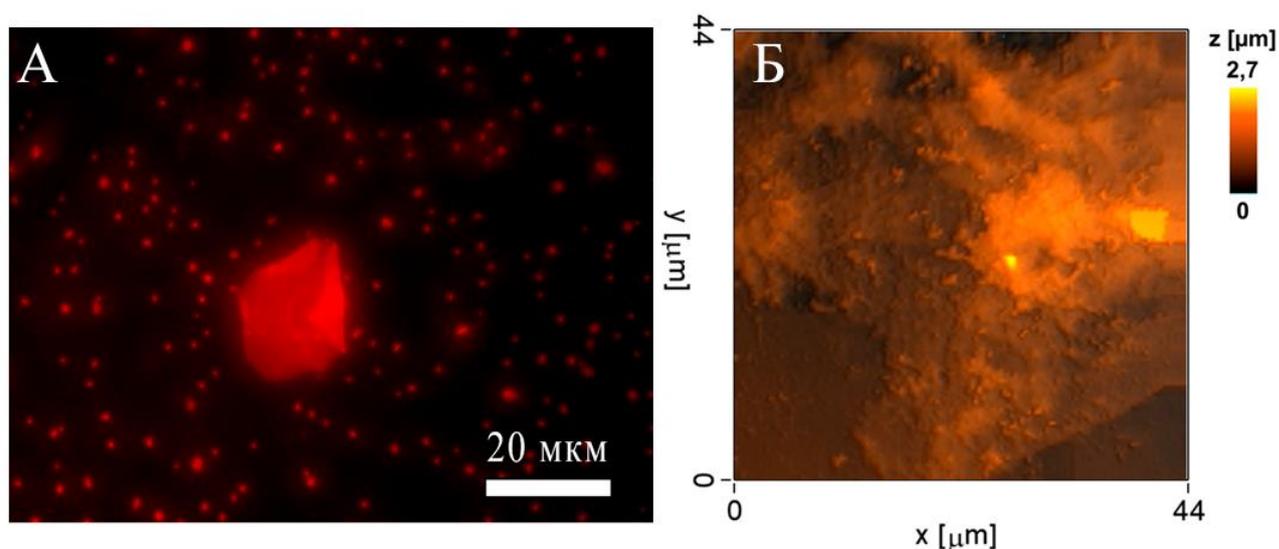


Рисунок 26 – Мигрировавшие в нижний отсек со *S.aureus* 2879М нейтрофилы. (А) – визуализация клеточного дебриса после фиксации и окрашивания, флуоресцентная микроскопия; (Б) – структура нетотических сетей со стафилококком без дополнительной фиксации, СИПМ.

На рисунке 27 визуализирован сам нейтрофил и располагающаяся вокруг него нетотическая сеть.

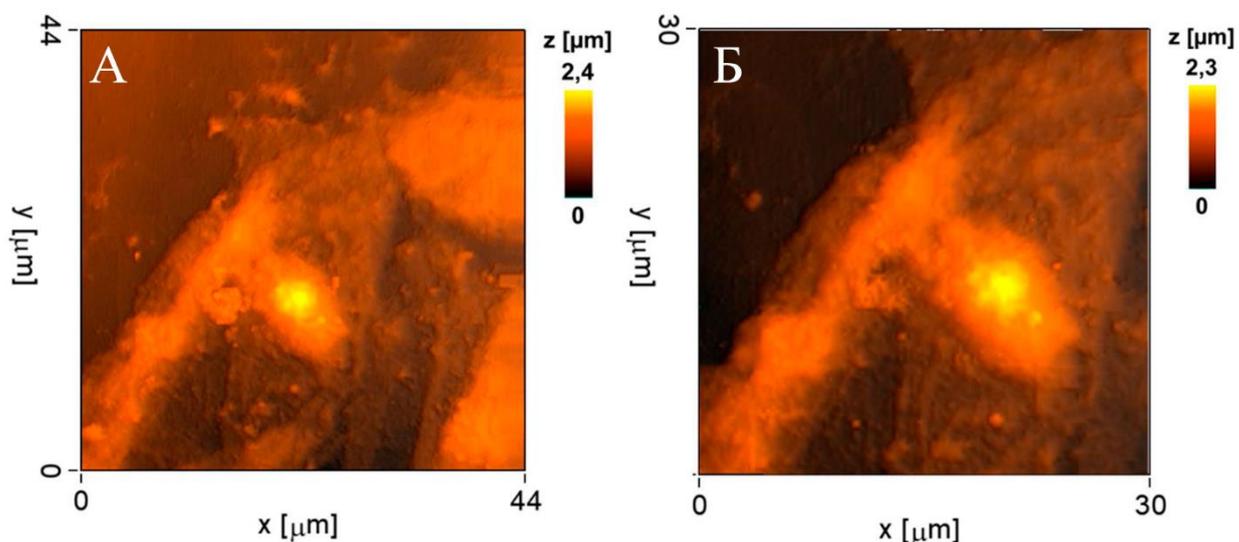


Рисунок 27 – Нейтрофил в центре нетотического облака после трансэндотелиальной миграции в нижнюю камеру со *S.aureus* 2879M. (А) – общий план; (Б) – увеличение.

## 3.2 Характер трансэндотелиальной миграции нейтрофилов в горизонтальной модели

### 3.2.1 Количественные показатели миграции нейтрофилов в горизонтальной модели трансэндотелиальной миграции

Горизонтальная модель была выбрана для анализа потенций нейтрофила к миграции, поскольку позволяла количественно определить и сравнить миграционные показатели, в качестве которых были приняты (1) процент активации нейтрофилов в процессе миграции (за активные принимались клетки, сместившиеся более чем на один свой диаметр, принятый за 10 мкм), (2) общая пройденная дистанция, (3) смещение, отражающее направленное перемещение относительно аттрактанта, (4) процент нейтрофилов, мигрирующих по направлению к аттрактанту. Помимо бактериальных аттрактантов использовались классические индукторы прямой (ЛТВ4, ФНО $\alpha$ ) и обратной (LXA4) миграции.

Поскольку в организме нейтрофилы мигрируют по поверхности эндотелия, а во многих лабораторных экспериментах применяются искусственные поверхности, было необходимо рассмотреть изменение поведения нейтрофилов в зависимости от типа подложки: полимера или эндотелия.

Обработка полученного массива экспериментальных данных осуществлялась с применением открытого программного обеспечения Icy (версия 2.5.1.0, Institut Pasteur, France BioImaging, Франция) на основе модели, описанной в работе Chenouard и соавторов [Chenouard et al., 2013], с индивидуально подобранными параметрами трекинга клеток. Детекция клеток основывалась на анализе контрастных характеристик объектов, а также на различиях в размерах между двумя клеточными популяциями – нейтрофилами и эндотелиоцитами, дополнительный анализ флуоресцентных изображений продукции АФК для трекинга не требовался. Такой подход позволил исключить ложноотрицательные результаты детекции для клеток, не продуцирующих АФК. Пример процедуры отслеживания клеток, построения и последующей фильтрации треков миграции представлен на рис. 28.

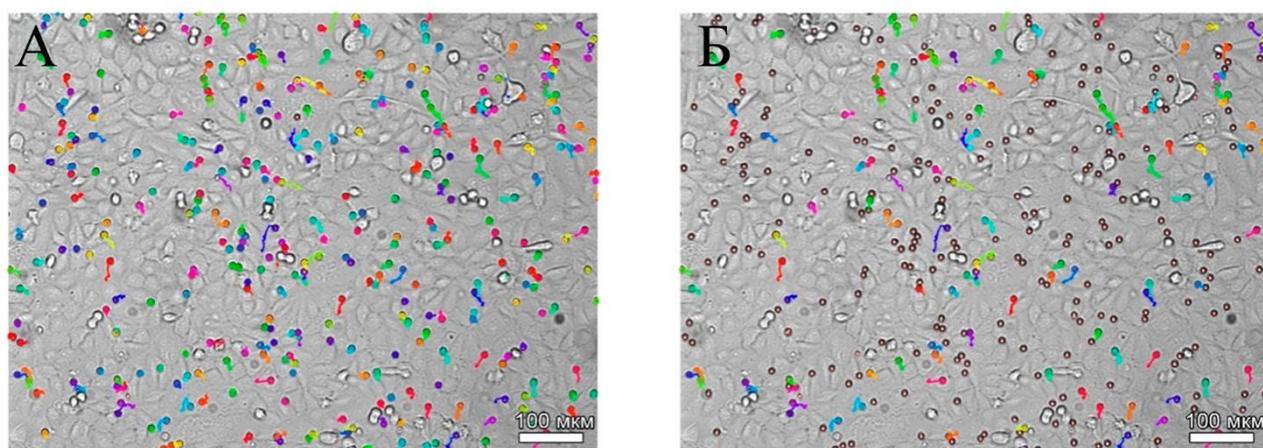


Рисунок 28 – Треки миграции нейтрофилов, визуализированные с помощью программного обеспечения Icy (на примере эксперимента с использованием *P.mirabilis* 649-2 в качестве хемоаттрактанта). (А) – результат детекции всех нейтрофилов в поле зрения; цветом обозначены индивидуальные траектории миграции каждой клетки в течение часа наблюдения; (Б) – результат фильтрации треков мигрировавших нейтрофилов: исключены траектории длиной менее 10 мкм; отсеянные клетки обозначены красными окружностями.

При проведении экспериментов на лабораторном пластике было выявлено, что практически все нейтрофилы плотно адгезировались к поверхности и не проявляли значительной миграционной активности по причине прочной адгезии к субстрату. При этом наличие бактерий в системе повышало уровень колебаний клеток в течение часа, то есть нейтрофилы стремились к перемещению, но адгезия была необратимой. Полученные данные по адгезии суммированы в таблице 3, дальнейший анализ результатов в модели с культуральным пластиком в качестве подложки не имел смысла по причине отсутствия процесса миграции.

Таблица 3 – Показатели активности нейтрофилов в течение эксперимента на культуральном пластике.

	% клеток, проявляющих активность (движение)	% клеток переместившихся на более чем 10 мкм
Контроль	99	3
<i>S.aureus</i> 2879M	99	0
<i>E.coli</i> 321	99	0
<i>P.mirabilis</i> 649-2	99	3
<i>E.faecalis</i> 645-p2	99	1
ФНО $\alpha$	99	0
LTV4	99	2
LXA4	99	7

В экспериментах на эндотелиальном монослое нейтрофилы свободно мигрировали по поверхности, полностью отсутствовало распластывание нейтрофилов по поверхности эндотелиального монослоя и необратимая адгезия, клетки свободно образовывали ламеллоподии и перемещались в любом направлении. По результатам анализа были построены векторы миграции всех нейтрофилов в серии экспериментов (рис. 29), которые показывают, что направленное движение нейтрофилов по отношению к хемоаттрактанту наблюдается только при использовании в качестве последнего бактериальных штаммов, в то время как биохимические хемоаттрактанты вызывали разрозненное стохастическое движение. Характер миграции также отличался в

зависимости от штамма: *S.aureus* 2879М, *E.coli* 321 и *P.mirabilis* 649-2 привлекали нейтрофилы и вызывали их направленное движение к контейнеру с бактериями, в то время как *E.faecalis* 645-p2 вызывал дезориентацию нейтрофилов и их преимущественную миграцию от контейнера. Контрольный эксперимент (отсутствие хемоаттрактанта) характеризовался стохастической миграцией нейтрофилов.

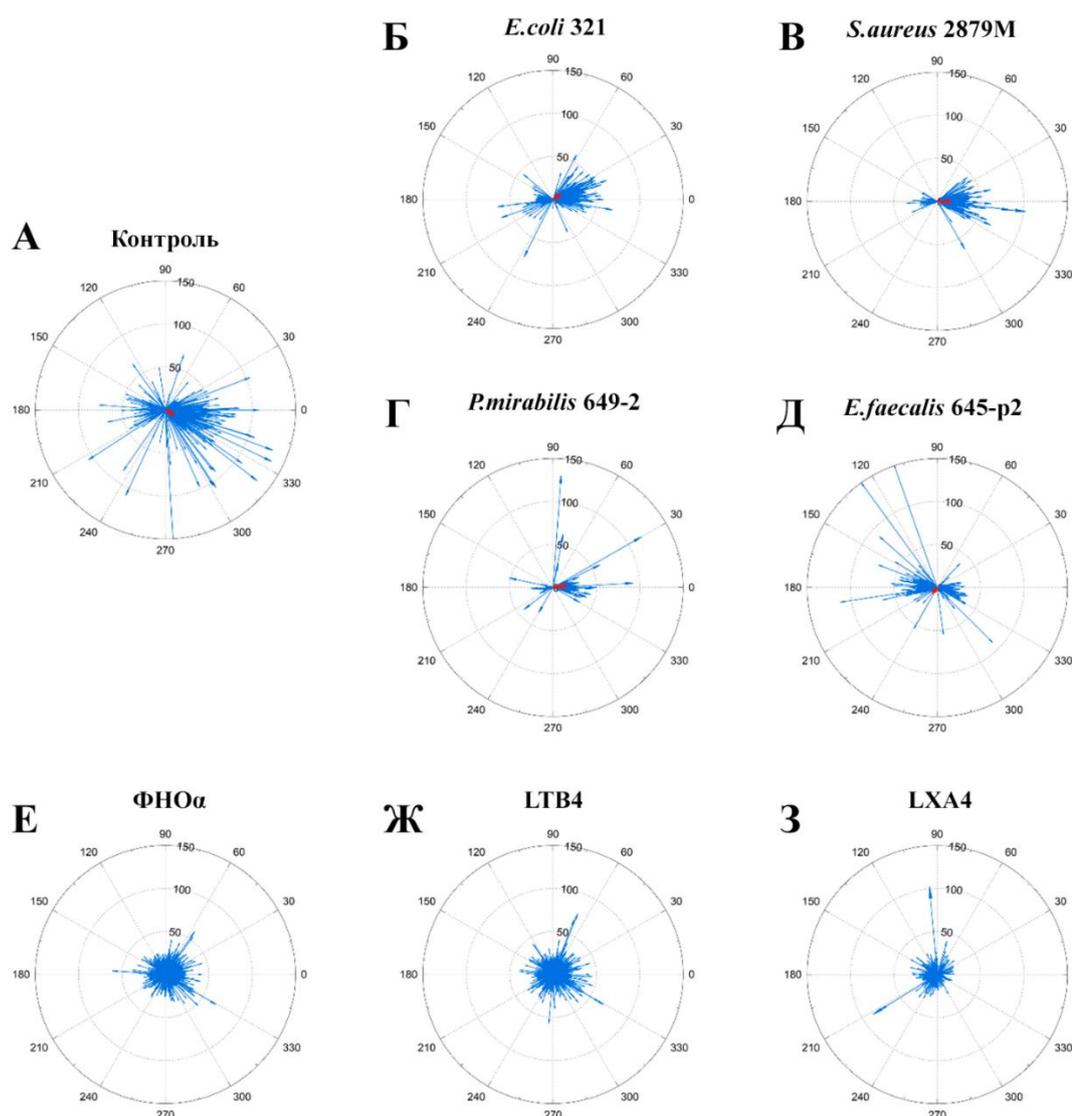


Рисунок 29 – Векторы миграции нейтрофилов в отсутствии (А) и в присутствии (Б-З) хемоаттрактанта в системе. На схеме синим цветом представлены векторы миграции высокоактивных нейтрофилов, красным — результирующий вектор миграции, нормализованный по совокупности всех мигрирующих клеток (для биохимических хемоаттрактантов результирующий вектор не указан в связи с пренебрежимо малым суммарным смещением). Точкой «0» обозначена локализация контейнера с хемоаттрактантом.

При подсчете показателей миграции статистически значимые различия среди всех бактериальных штаммов были найдены только для *P.mirabilis* (табл. 4), 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 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 адгезии между нейтрофилами и эндотелиоцитами. Поляризации нейтрофилов и их направленной миграции в этих экспериментах не наблюдалось.

Для выявления влияния биохимических хемоаттрактантов на миграцию, вызванную бактериальными штаммами, были проведены эксперименты, где использовалось одновременно два хемоаттрактанта: бактериальный и биохимический (табл. 4). ФНО $\alpha$  во всех случаях увеличивал дистанцию, пройденную нейтрофилами, при этом характер миграции становился более стохастическим. ЛТВ4 также увеличивал пройденную дистанцию, однако в этом случае сохранялась направленность движения нейтрофилов к бактериальному аттрактанту. 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 4 – 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 <sup>a</sup>	15,71 ± 0,91 <sup>a</sup>	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 $\alpha$	50,05 ± 19,17	36,40 ± 8,19 <sup>a</sup>	17,55 ± 1,84	50,69 ± 25,79
LTB4	42,04 ± 12,31	38,83 ± 6,84 <sup>a</sup>	18,25 ± 2,31	49,06 ± 10,33
LXA4	45,74 ± 14,50	38,38 ± 8,24 <sup>a</sup>	15,48 ± 1,14 <sup>a</sup>	45,90 ± 37,22
<i>E.coli</i> 321 + ФНО $\alpha$	59,91 ± 18,64	77,78 ± 15,72 <sup>абв</sup>	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 <sup>б</sup>
<i>E.coli</i> 321 + LXA4	59,79 ± 25,94	81,27 ± 17,68 <sup>аб</sup>	28,16 ± 14,43	66,62 ± 22,81
<i>P.mirabilis</i> 649-2 + ФНО $\alpha$	55,59 ± 13,90 <sup>*б</sup>	75,79 ± 9,62 <sup>абв</sup>	20,32 ± 2,60 <sup>б</sup>	39,87 ± 21,48 <sup>б</sup>
<i>P.mirabilis</i> 649-2 + LTB4	61,08 ± 30,73	63,76 ± 9,58 <sup>бв</sup>	18,11 ± 0,95 <sup>б</sup>	35,88 ± 4,44 <sup>б</sup>
<i>P.mirabilis</i> 649-2 + LXA4	63,88 ± 14,25	65,09 ± 3,97 <sup>абв</sup>	23,42 ± 8,54	56,04 ± 28,38
<i>S.aureus</i> 2879M+ ФНО $\alpha$	75,24 ± 22,82	75,05 ± 15,41 <sup>б</sup>	19,89 ± 2,77	63,88 ± 29,28
<i>S.aureus</i> 2879M+ LTB4	70,54 ± 16,48	54,37 ± 4,85 <sup>б</sup>	19,98 ± 2,30	70,27 ± 14,00 <sup>б</sup>
<i>S.aureus</i> 2879M+ LXA4	56,92 ± 10,10	40,33 ± 3,05 <sup>аб</sup>	17,42 ± 2,38	54,43 ± 33,78
<i>E.faecalis</i> 645-p2 + ФНО $\alpha$	82,79 ± 7,77	91,54 ± 2,68 <sup>абв</sup>	20,29 ± 0,76	31,03 ± 6,55
<i>E.faecalis</i> 645-p2 + LTB4	57,83 ± 16,04	60,92 ± 6,54 <sup>бв</sup>	21,53 ± 2,97	77,07 ± 1,56 <sup>б</sup>
<i>E.faecalis</i> 645-p2 + LXA4	44,79 ± 18,29	43,82 ± 4,30	18,02 ± 2,23	56,15 ± 12,03

<sup>a</sup> – различия с контролем статистически значимы,  $p < 0,05$ ;

<sup>б</sup> – различия с бактериальным хемоаттрактантом статистически значимы,  $p < 0,05$ ;

<sup>в</sup> – различия с биохимическим фактором статистически значимы,  $p < 0,05$ ; (t-test, U-test; n = 4).

Помимо миграционных характеристик по флуоресценции нейтрофилов при окрашивании клеток красителем 6-Карбокси-Н<sub>2</sub>DCFDA для детекции АФК оценивалась их активация. На рис. 30 приведены примеры флуоресцентного окрашивания клеток АФК красителем в присутствии исследуемых хемоаттрактантов.

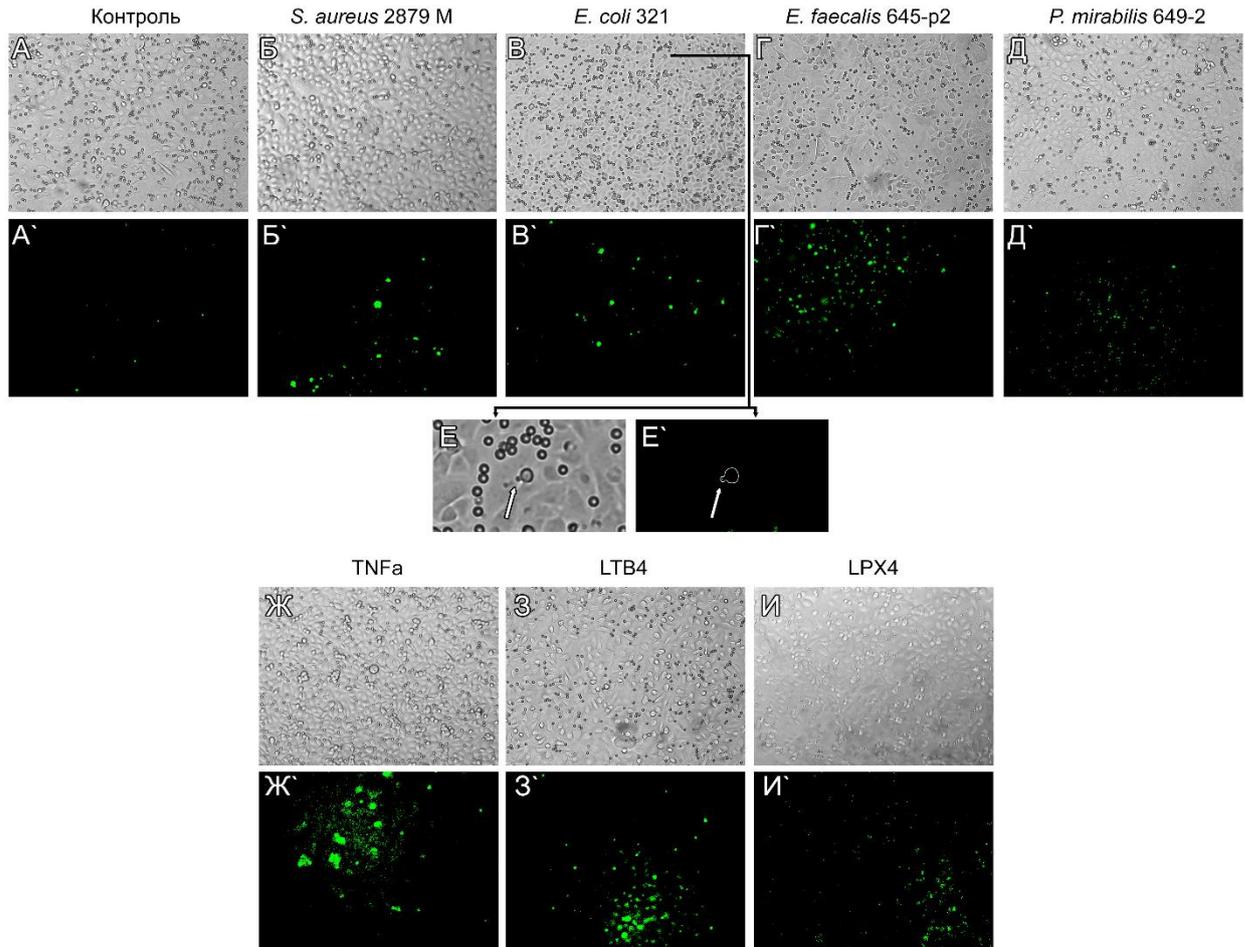


Рисунок 30 – Продукция АФК нейтрофилами при миграции по поверхности эндотелиальных клеток в отсутствие (А, А') и в присутствии хемоаттрактантов (Б, Б' - И, И'). (Е, Е') Стрелка указывает на продукцию АФК эндотелиальными клетками, распространяющуюся вдоль направления миграции в одном из экспериментов с *E.coli* 321.

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 ФНО $\alpha$ , что, вероятно, было обусловлено его провоспалительными свойствами и способностью индуцировать клеточное повреждение [Zhao et al., 2023]. Кроме того, наблюдалась неравномерная «зональность» выделения АФК, что может быть связано с вторичной активацией клеток уже секретированными АФК, которые способны выполнять роль сигнальных молекул или вызывать неспецифическую альтерацию [Fichman et al., 2023].

В экспериментах с использованием в качестве хемоаттрактантов ФНО $\alpha$ , LTB $_4$  и LXA $_4$ , где отсутствовала направленная миграция по создаваемому градиенту, регистрировалась продукция АФК нейтрофилами (рис. 30 Ж, З, И). Отсутствие потенциалов к миграции при активации могло быть обусловлено недостаточной величиной градиента аттракции. Известно, что поляризация нейтрофилов и их миграция по градиенту LTB $_4$  опосредуются инфламмасомой NLRP3, экспрессия которой у лейкоцитов (преимущественно макрофагов) значительно усиливается после контакта с бактериальными факторами патогенности, в частности липополисахаридом [van Bruggen et al., 2023]. В отсутствие NLRP3 поляризации не происходит, и активированные нейтрофилы либо мигрируют хаотично, либо адгезируются к эндотелию. Это также объясняет почему в экспериментах с созданием совместного бактериально-биохимического градиента аттракции миграция нейтрофилов всегда усиливалась в экспериментах с грамотрицательными *E.coli* и *P.mirabilis*.

Отсутствие направленной миграции в ответ на ФНО $\alpha$  в любых условиях может объясняться продукцией эндотелиальными клетками хемокина CXCL1 в ответ на стимуляцию ФНО $\alpha$ . 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. В экспериментах на здоровых мышах (контроль) и мышах с острым респираторным дистресс-синдромом (опыт) было показано, что LXA4 в чистом виде не влияет на экспрессию проинфламаторных молекул (ФНО $\alpha$  и IL-1 $\beta$ ) и продукцию АФК нейтрофилами. Однако в присутствии бактерий LXA4 ингибирует экспрессию этих молекул и индуцирует альтерацию клеток [Pan et al., 2022]. По результатам проведённых экспериментов можно предположить, что активационный эффект LXA4 связан прежде всего с гиперадгезивностью нейтрофилов к эндотелию – феномене, впервые описанном в работе [Lerner et al., 1993]. Это согласуется с минимальной дистанцией миграции клеток в экспериментах с LXA4 (табл. 4). Адгезия, в свою очередь, индуцирует активацию нейтрофилов, продукцию АФК, а также АФК и АФА эндотелиоцитами (рис. 30 И).

### **3.2.2 Исследование миграции нейтрофилов в горизонтальной модели методом СИПМ**

Для исследования морфологических изменений клеток в процессе миграции методом СИПМ использовали аналогичную систему. При сканировании нейтрофилов на полимерной поверхности большая часть клеток плотно распласталась на подложке и находилась в покое во время сканирования, как и в случае оптического наблюдения. На рисунке 31 представлен фрагмент сканирования трех нейтрофилов, в эксперименте с использованием *E.coli* 321 в качестве хемоаттрактанта (контейнер с аттрактантом локализован в нижней части изображения). Первоначальное сканирование проводилось в сверхскоростном режиме с интервалом между кадрами порядка 1 минуты для фиксации динамики морфологических изменений клеток. Оба нейтрофила были плотно распластаны по поверхности чашки Петри. Верхняя клетка при этом оставалась практически иммобилизованной, а нижняя образовывала ламеллоподию, вступая в контакт с первой.

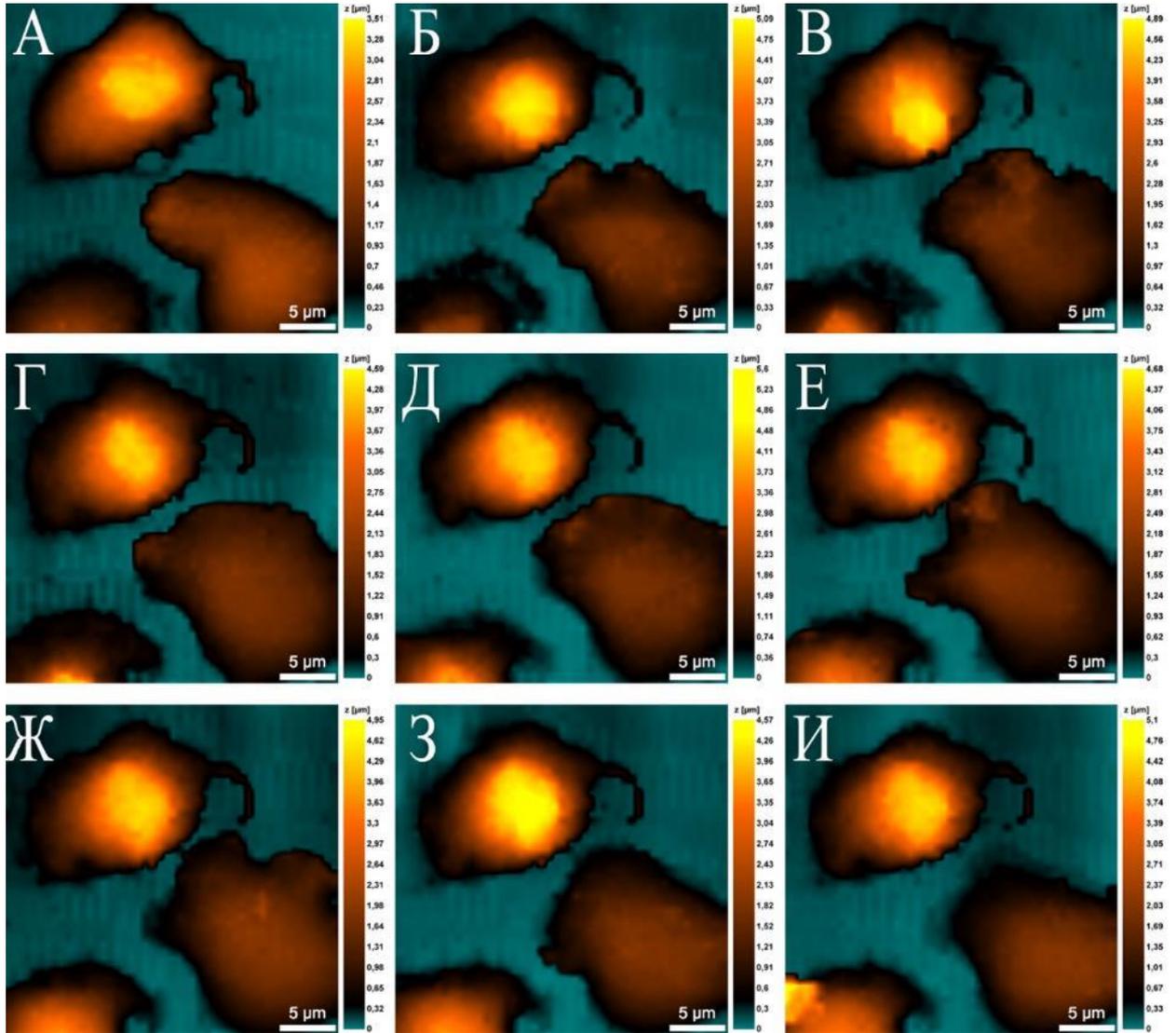


Рисунок 31 – Нейтрофилы на культуральном пластике в присутствии контейнера с хемоаттрактантом (внизу, *E.coli* 321). (А-Д) – последовательное сканирование области с интервалом в 1 минуту; (Е) – наиболее близкий контакт между нейтрофилами; (Ж) – обратное отдаление правой клетки от верхней.

Отсутствие выраженного движения побудило к повышению разрешения изображения (рисунок 32), поскольку было очевидно, что клетки остаются в области сканирования. Повышение разрешения сопровождается снижением скорости сканирования.

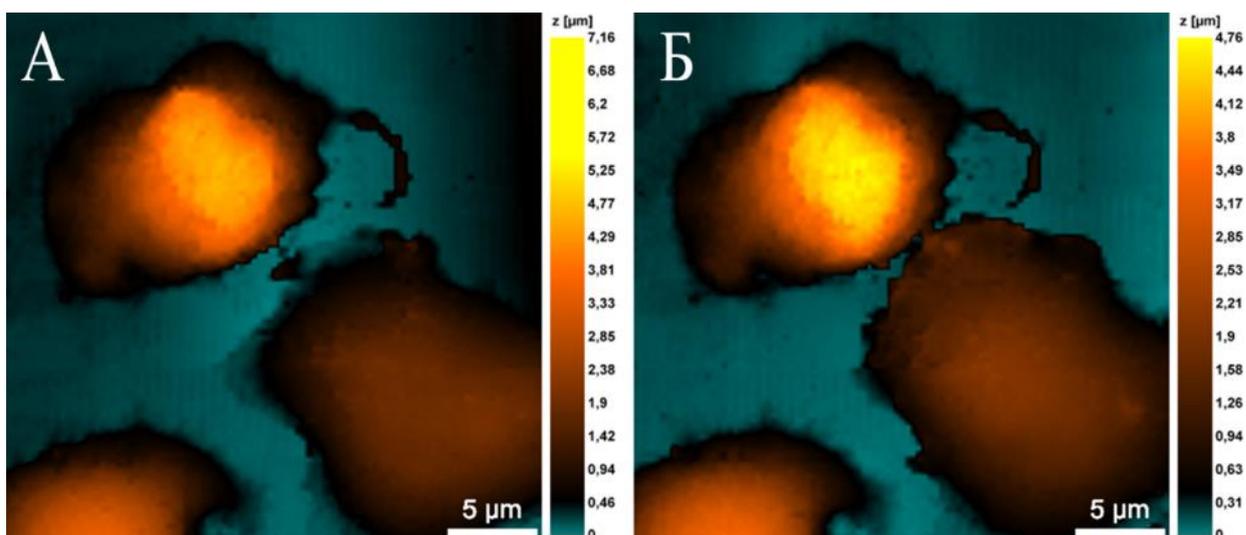


Рисунок 32 – Продолжение сканирования области, представленной на рисунке 31. Интервал между кадрами – 4 минуты.

В данных условиях наблюдалось слабое межклеточное взаимодействие без выраженной направленной миграции. В то же время незначительные перемещения клеток регистрировались в отсутствии хемоаттрактанта (рис. 33), видимо, по причине уменьшения связанной с активацией плотной адгезии. На представленных изображениях отчётливо визуализировалось динамическое перераспределение зон адгезионных контактов внутри нейтрофила с течением времени, что проявлялось в формировании участков повышенной жесткости в правой части клетки. Как и в присутствии хемоаттрактанта, клетки демонстрировали тенденцию к формированию межклеточных контактов. После реализации такого контакта иммобилизованная клетка подверглась гибели, оставив после себя зону адгезии с клеточным дебрисом (рис. 34). Непосредственно перед гибелью наблюдалось практически полное исчезновение высокоригидных зон адгезионных контактов (рис. 33). Кроме того, среднее значение модуля Юнга погибающей клетки прогрессивно снижалось в процессе сканирования (рис. 35). На основании того, что гибель клетки сопровождалась снижением модуля Юнга клеточной мембраны, можно предположить реализацию механизма некроза/некроптоза.

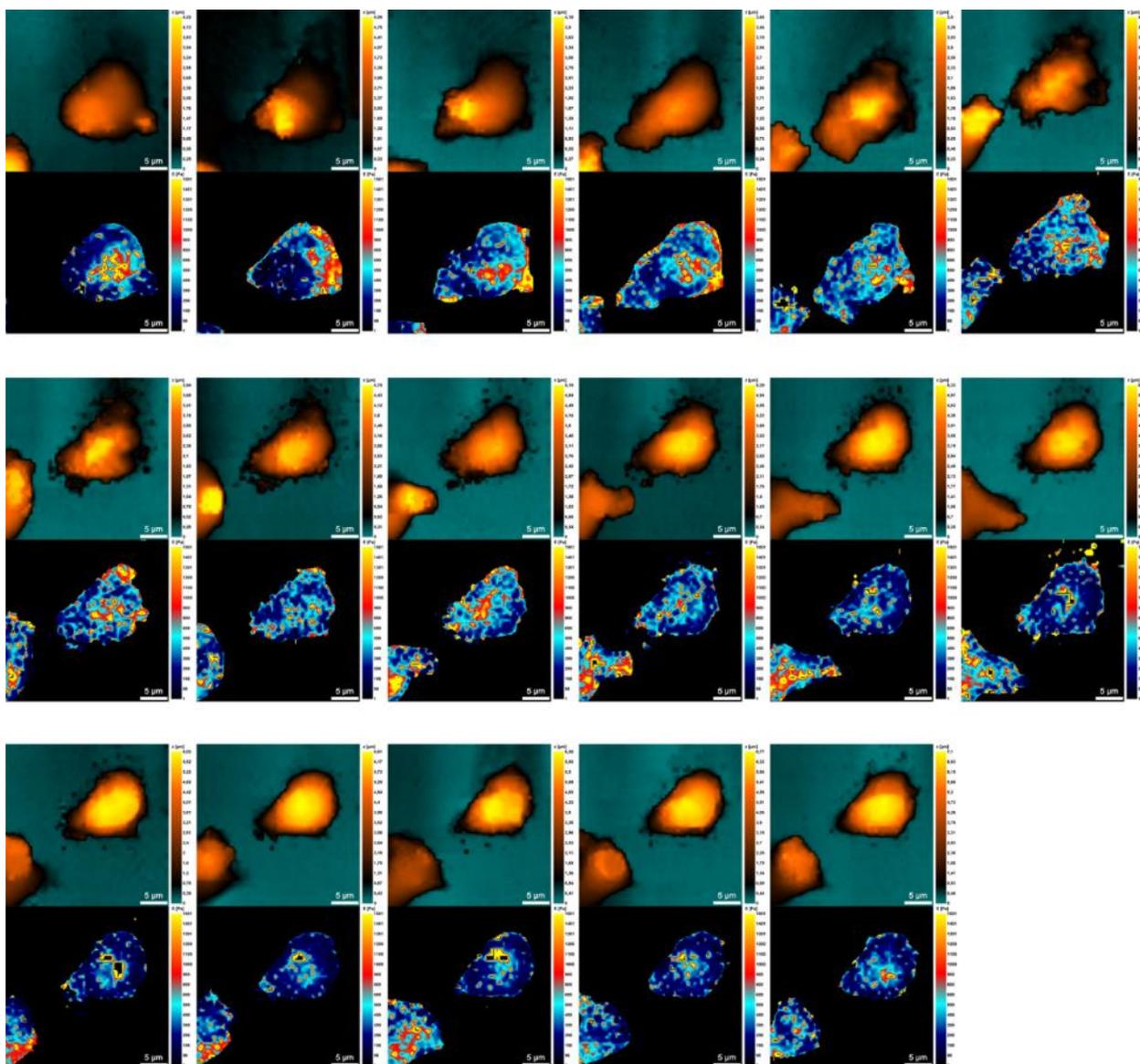


Рисунок 33 – Динамика перемещения и изменения морфологии (верхняя линия) и распределения модуля Юнга (нижняя линия) двух нейтрофилов на культуральном пластике. Средний модуль упругости верхней клетки снижается перед ее смертью. Интервал между кадрами – 1 минута.

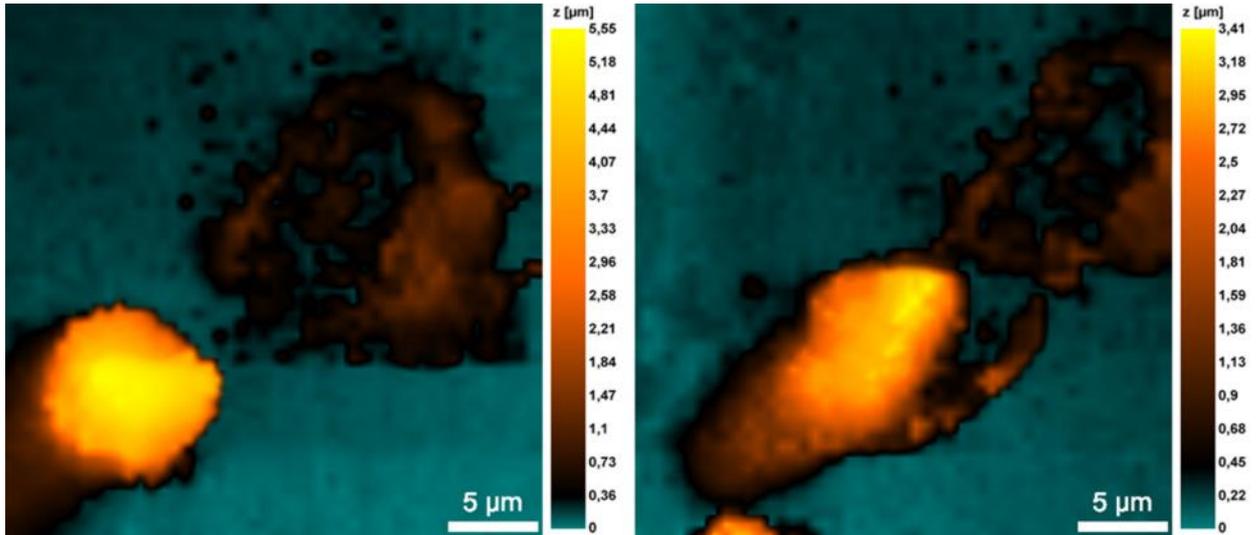


Рисунок 34 – «Адгезионный» след и клеточный дебрис после смерти нейтрофила на культуральном пластике.

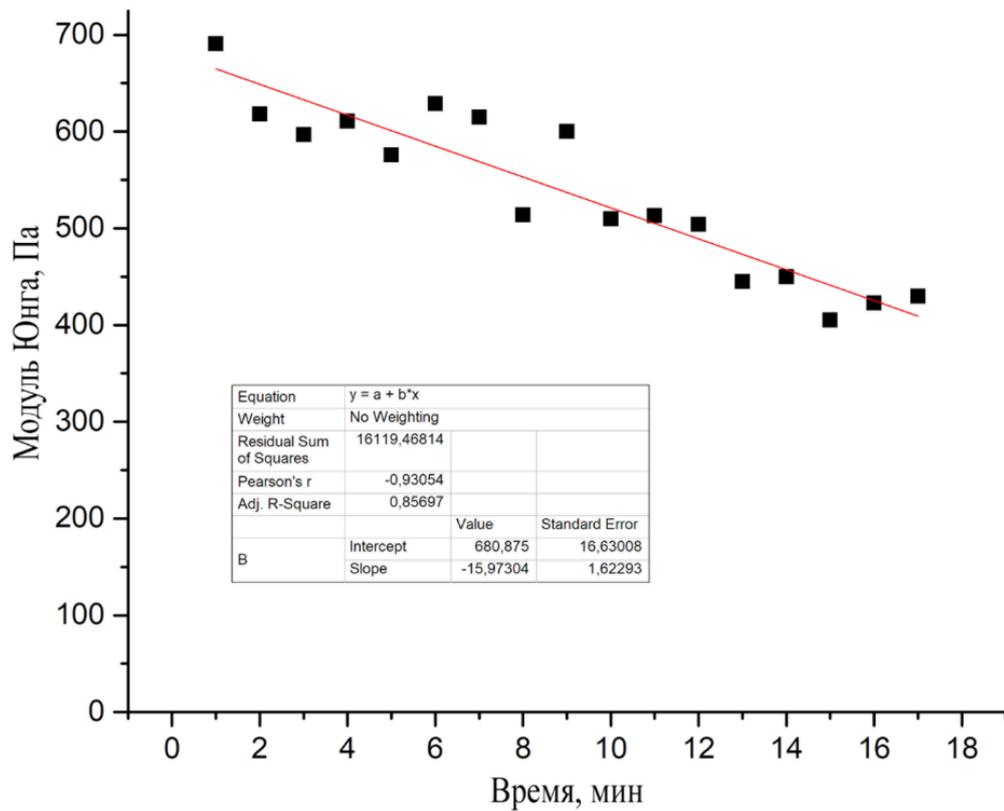


Рисунок 35 – Средний модуль Юнга погибающей клетки во время сканирования. Модуляции значений объясняются изменением морфологии клетки в процессе сканирования.

Таким образом наличие хемоаттрактанта усиливало распластывание и необратимую адгезию клеток на поверхности чашек Петри в процессе наблюдения.

При исследовании методом СИПМ нейтрофилов на поверхности эндотелия наибольший интерес представляли опыты с *S.aureus* 2879М и *P.mirabilis* 649-2, поскольку в них наблюдалась однозначная миграция нейтрофила в направлении бактериального хемоаттрактанта. Результаты сканирования в системах представлены на рис. 36 и рис. 37 соответственно. Зарегистрирована целенаправленная миграция нейтрофилов вдоль эндотелиальных клеток, сопровождающаяся формированием ламеллоподий и последующим «подтягиванием» остального объема цитоплазмы. Преимущественным путём миграции служили межклеточные границы эндотелиоцитов, таким образом нейтрофилы перемещались как бы по «направляющим». Кроме того, отмечались изменения морфологии эндотелиальных клеток, по которым осуществлялось передвижение нейтрофилов.

При перемещении нейтрофилов их средний модуль Юнга существенно не изменялся (рис. 36 Б, 37 Б). Однако наблюдались локальные изменения механических свойств: значения модуля Юнга в области ядра превышали таковые в ламеллоподиях, причём данные параметры варьировали в зависимости от текущей морфологии клетки.

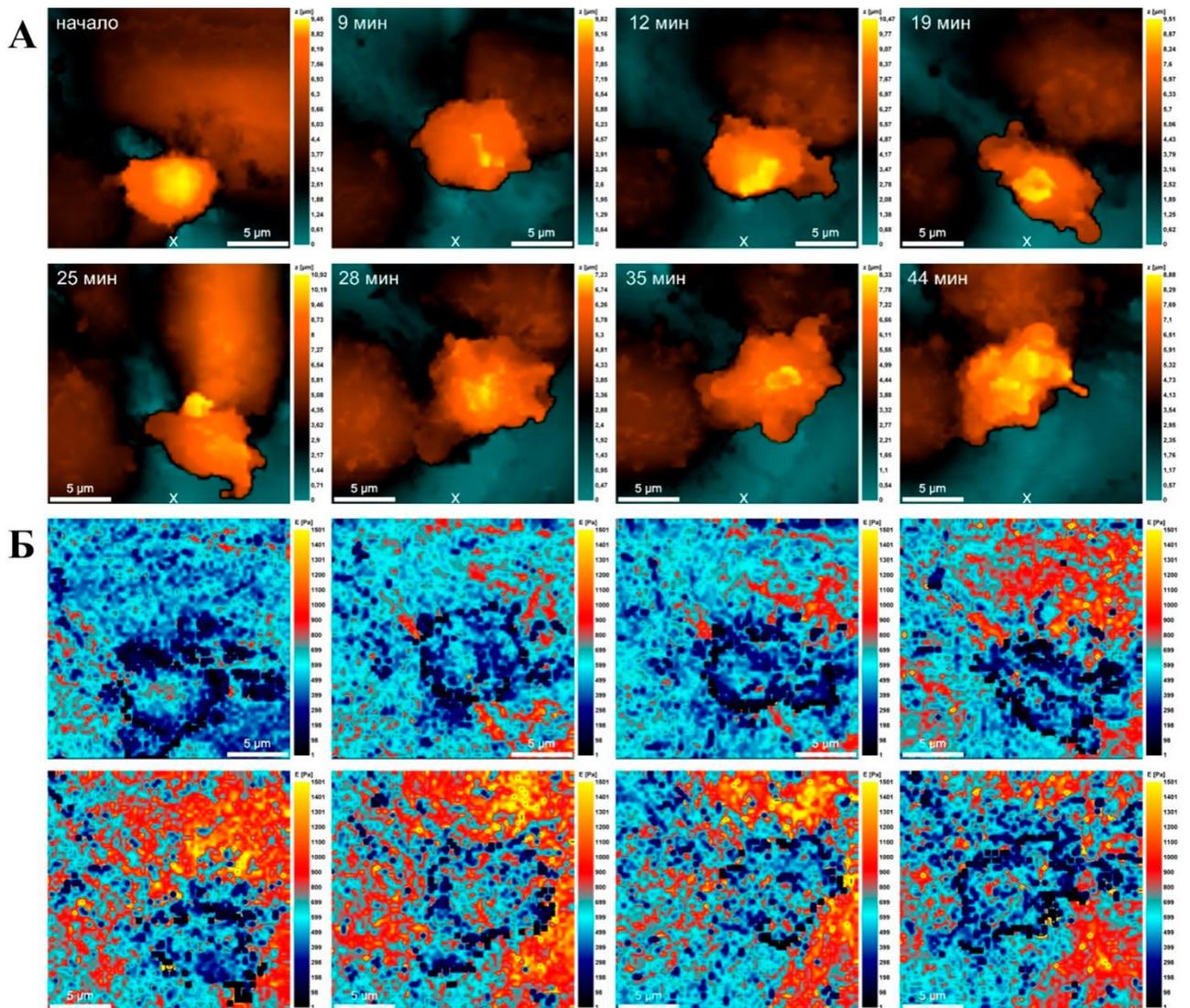


Рисунок 36 – СИПМ-сканы, отражающие морфологию (А) и распределение модуля Юнга (Б) эндотелиальных клеток (EA.hy926) и нейтрофилов, мигрирующих в направлении контейнера со *S.aureus* 2879М. X – место контейнера с хемоаттрактантом.

Высокая подвижность активных нейтрофилов сопровождалась более значительными изменениями клеточной морфологии: клетки утрачивали компактную форму с чётко выраженными ламеллоподиями и приобретали распластанную конфигурацию, как бы продвигаясь вдоль линии межклеточного контакта эндотелиоцитов (рис. 37).

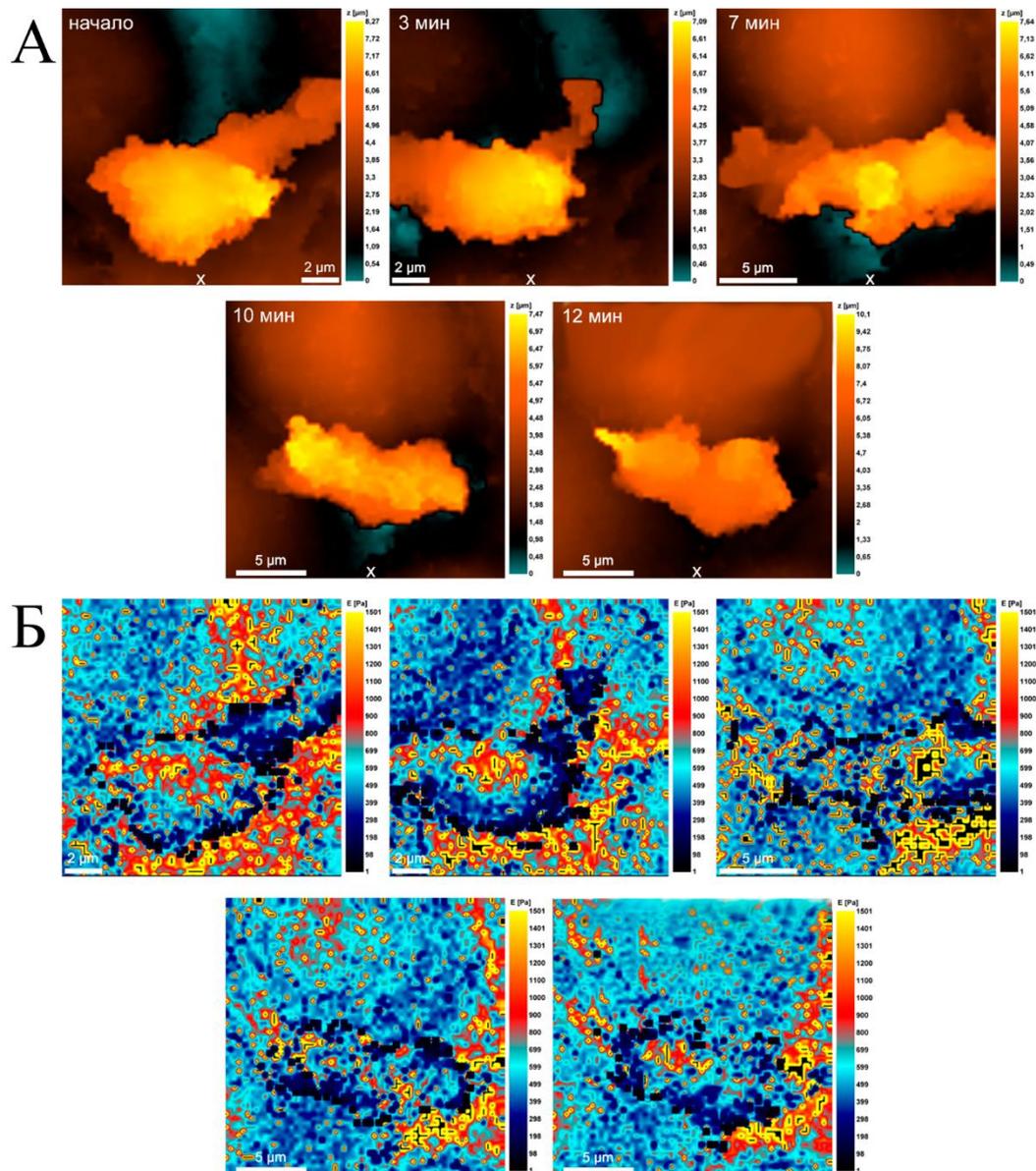


Рисунок 37 – СИПМ-сканы, отражающие морфологию (А) и распределение модуля Юнга (Б) эндотелиальных клеток (EA.hy926) и высокоактивных нейтрофилов, мигрирующих в эксперименте с *P.mirabilis* 649-2 в качестве хемоаттрактанта. X – место контейнера с хемоаттрактантом.

Было отмечено, что при миграции нейтрофила актин перераспределяется с периферии клетки к ее центру и затем к формирующейся ламеллоподии, что увеличивает средний модуль Юнга клетки при перемещении с 600 Па до 1200-1800 Па (рис. 38).

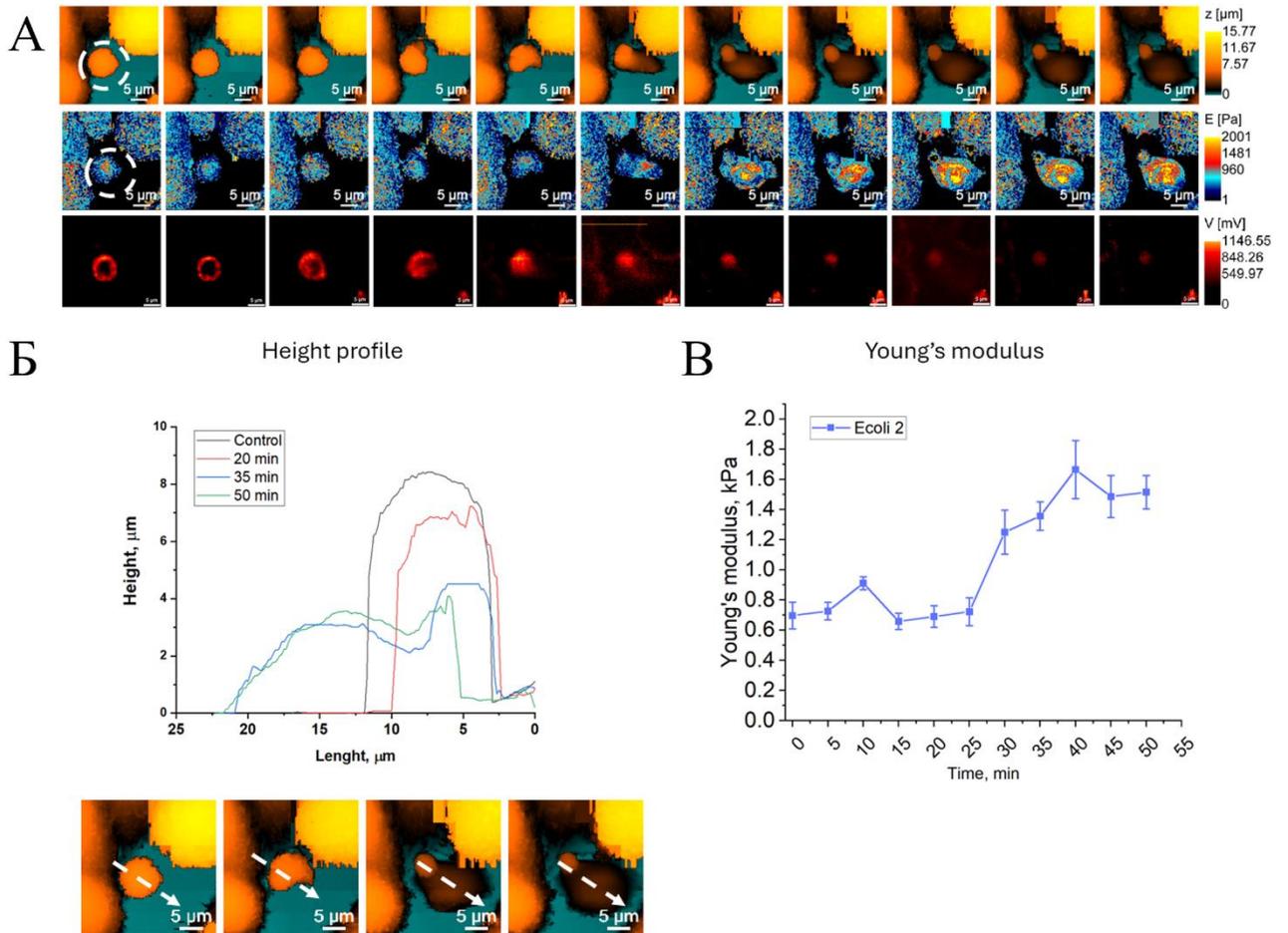


Рисунок 38 – Перемещение нейтрофила при миграции по градиенту, созданному *E.coli* 321. (А) – топография, распределение модуля Юнга и конфокальная микроскопия перемещения. Клетка образует ламеллоподию, куда перераспределяется актин с клеточной периферии, а модуль Юнга возрастает. Интервал между кадрами – 5 минут; (Б) – изменение профиля мигрирующего нейтрофила во времени; (В) – изменение среднего модуля Юнга мигрирующего нейтрофила во времени.

В то же время в экспериментах с *E.coli* 321 и *E.faecalis* 645-p2, где, согласно результатам, описанным в разделе 3.2.1, миграция носила более стохастический характер, многие клетки сохраняли округлую форму и постоянные значения модуля упругости (рис. 39).

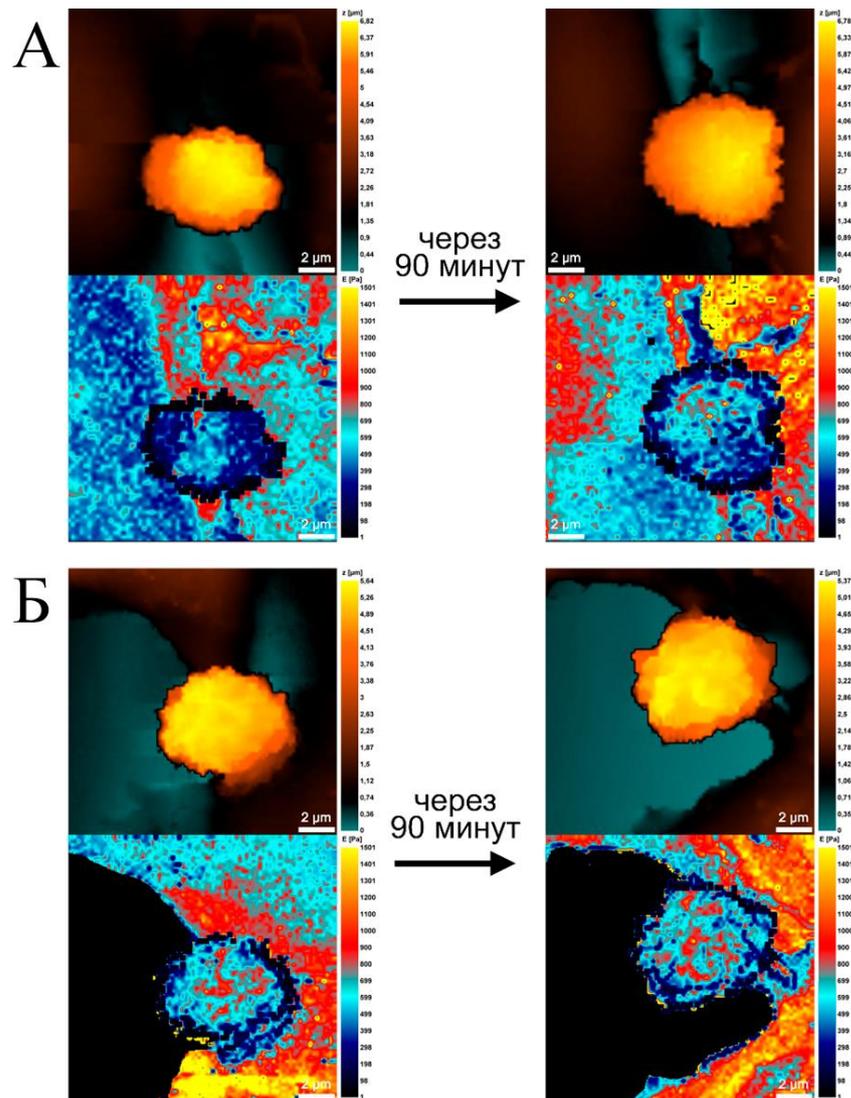


Рисунок 39 – Морфология и распределение модуля Юнга нейтрофилов в экспериментах с *E.coli* 321 (А) и *E.faecalis* 645-p2 (Б) при непрерывном 90-минутном сканировании методом СИПМ в горизонтальной модели.

Аналогичная картина наблюдалась при использовании биохимических хемоаттрактантов. На рис. 40 представлены нейтрофилы, миграция которых индуцировалась ФНО $\alpha$ . В первые 30 минут регистрировалось незначительное смещение клеток (рис. 39 А, Б), после чего происходила потеря адгезии к подложке (рис. 40 В). При этом модуль Юнга нейтрофилов оставался стабильным в течение всего периода сканирования. Способность к направленной миграции продемонстрирована на рис. 41, где нейтрофил осуществлял перемещение в камере с градиентом ЛТВ4.

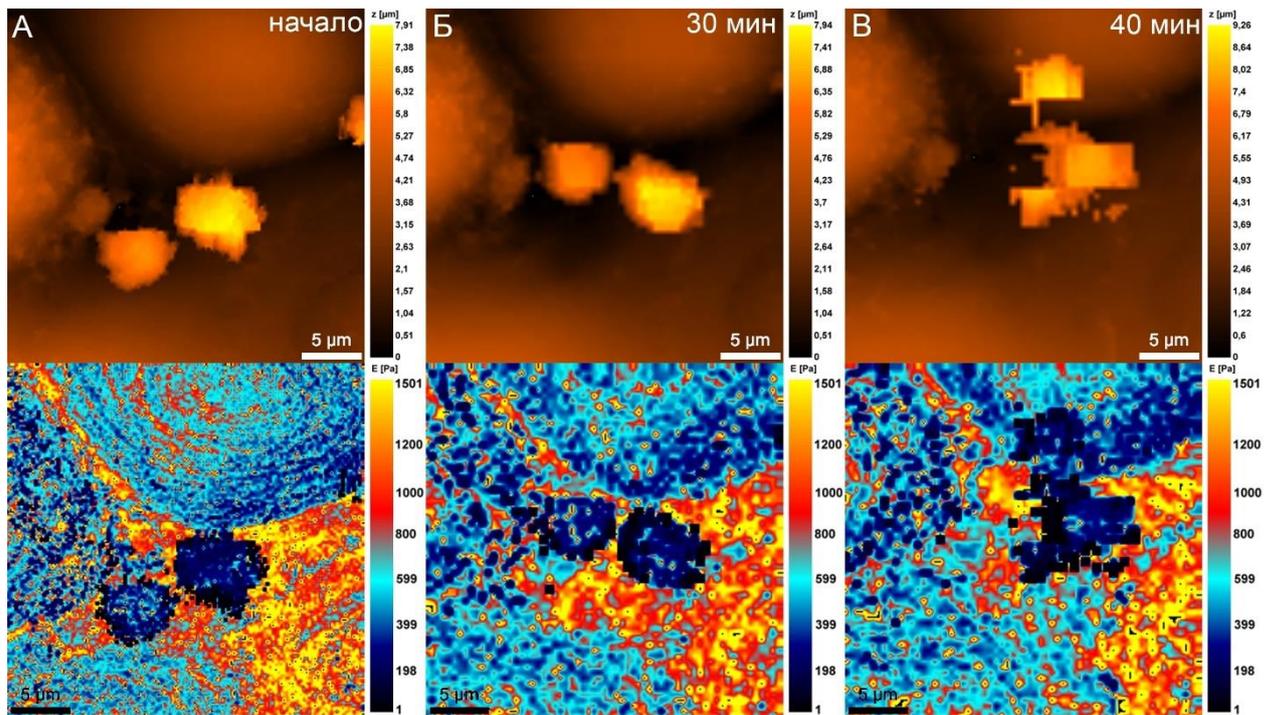


Рисунок 40 – Нейтрофилы, мигрирующие по поверхности эндотелиального монослоя в присутствии ФНО $\alpha$ , морфология (вверху) и распределение модуля Юнга (внизу). (А) – нейтрофилы адгезировались к эндотелиальным клеткам; (Б) – незначительное движение нейтрофилов в течение первых 30 минут; (В) – деадгезия нейтрофилов с поверхности эндотелиальной клетки.

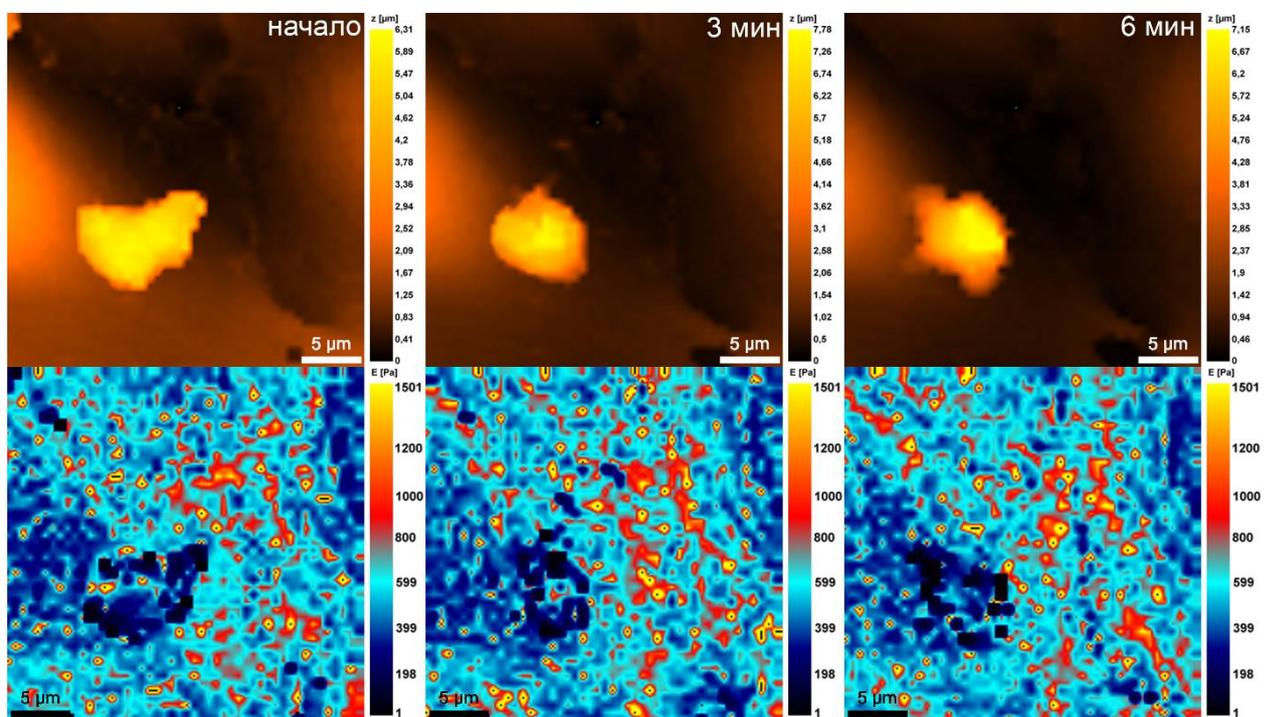


Рисунок 41 – Мембрано-цитоскелетные перестройки нейтрофила при движении под действием LTB $_4$ . Морфология (вверху) и распределение модуля Юнга (внизу). Интервал между кадрами – 3 минуты.

Подытоживая, в горизонтальной модели было наглядно продемонстрировано, что миграционная активность нейтрофилов и направленность общего вектора миграции 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 $\alpha$ , LTB $_4$ , LXA $_4$  вызывали направленное движение только в сочетании с бактериями. Максимальное расстояние миграции отдельных нейтрофилов наблюдалось при использовании в качестве хемоаттрактанта *S.aureus* 2879М и *P.mirabilis* 649-2.

В контрольных экспериментах и при использовании в качестве хемоаттрактанта *E.faecalis* 645-p2 регистрировались высокая подвижность нейтрофилов и хаотичность направления миграции, что проявлялось в минимальном смещении общего вектора движения (рис. 29). Вероятно, в отсутствие чёткого градиента хемоаттрактанта нейтрофилы реализуют механизм «сканирования» пространства, аналогичный описанному для этапа диапедеза [Carman et al., 2007; Carman, 2009]. Ранее было также показано, что *E.faecalis* способен подавлять распознавание и миграцию макрофагов [Nunez et al., 2018]. Аналогичный механизм «дезориентации» мог действовать и на нейтрофилы, вызывая их миграцию в обратном направлении. Поскольку бактериальные аттрактанты помещались в контейнеры с мембранами, проницаемыми только для молекул с молекулярной массой менее 14 кДа, можно заключить, что факторы *E.faecalis* 645-p2, ответственные за нарушение миграции, имеют молекулярную массу в этом диапазоне.

Следует также отметить, что феномен роения нейтрофилов наблюдался в горизонтальной модели с использованием контейнера для хемоаттрактантов точно также как ранее в вертикальной. Как правило, данное явление регистрировалось в экспериментах с биохимическими аттрактантами, которые, предположительно, легче диффундировали через мембрану благодаря своей низкой молекулярной массе. На рис. 42 представлен пример роения нейтрофилов в эксперименте с ФНО $\alpha$ .

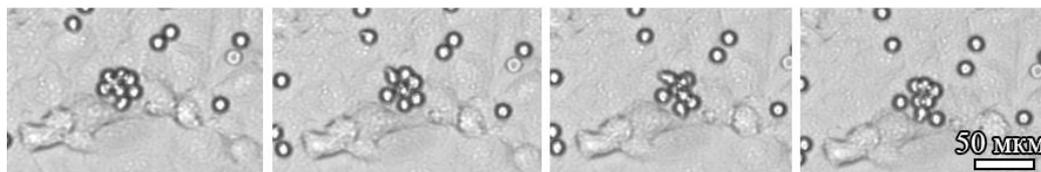


Рисунок 42 – Роение нейтрофилов на поверхности эндотелиальных клеток в горизонтальной модели с ФНО $\alpha$ , интервал между кадрами – 4 минуты.

### 3.3 Особенности миграции нейтрофилов в проточной системе миграции

Исследования показали, что статичные модели неэффективно демонстрируют способность нейтрофилов к плотной адгезии к эндотелию. Чтобы спровоцировать такие контакты – необходимые для остановки клеток в кровотоке – и смоделировать динамику процесса, были проведены эксперименты в проточной системе с хемоаттрактантом. В ней нейтрофилы были вынуждены преодолевать ток жидкости, мигрируя к источнику хемоаттрактанта.

При моделировании направленного тока жидкости предполагалось, что основная масса нейтрофилов будет мигрировать либо по направлению потока (от источника хемоаттрактанта), либо в сторону контейнера с хемоаттрактантом. Однако экспериментальные данные продемонстрировали, что капиллярный ток жидкости со скоростью 1 мл/ч не оказывал значимого влияния на поведение клеток в системе и не ограничивал их миграцию в произвольных направлениях.

На рис. 43 представлены два последовательных снимка одной и той же области, сделанные с интервалом в 10 минут (при скорости потока 1 мл/ч) в контрольном эксперименте без хемоаттрактанта. Вместо направленной миграции регистрировалось стохастическое перемещение нейтрофилов. Значимые изменения в характере движения клеток наблюдались лишь при двадцатикратном увеличении скорости потока до 20 мл/ч, что соответствовало току в венуле (рис. 44), что сопровождалось выраженной агрегацией и переносом клеток потоком жидкости.

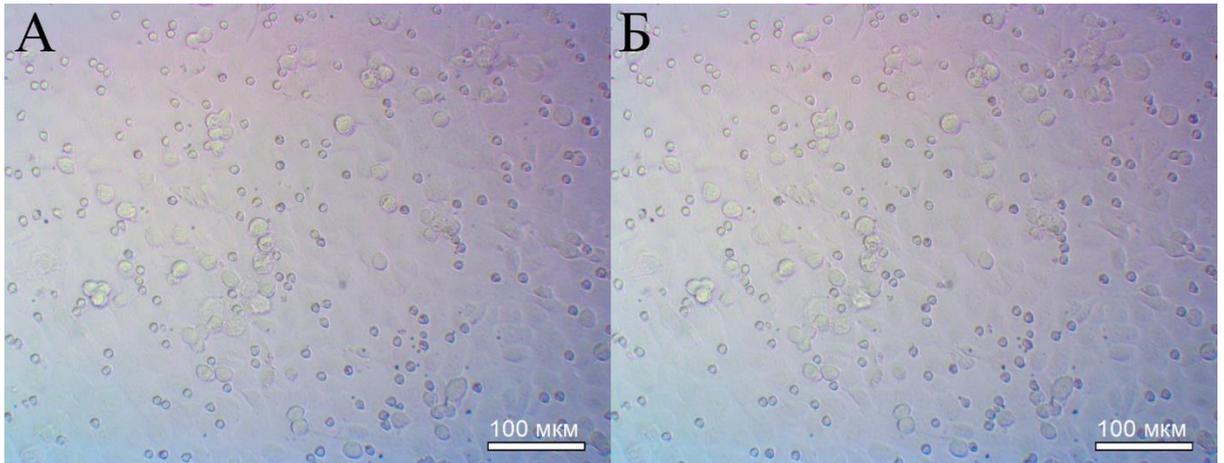


Рисунок 43 – Световая микроскопия нейтрофилов на эндотелиальных клетках в контрольном эксперименте в начале съемки (А) и через 10 минут (Б) при моделируемом токе среды со скоростью 1 мл/ч.

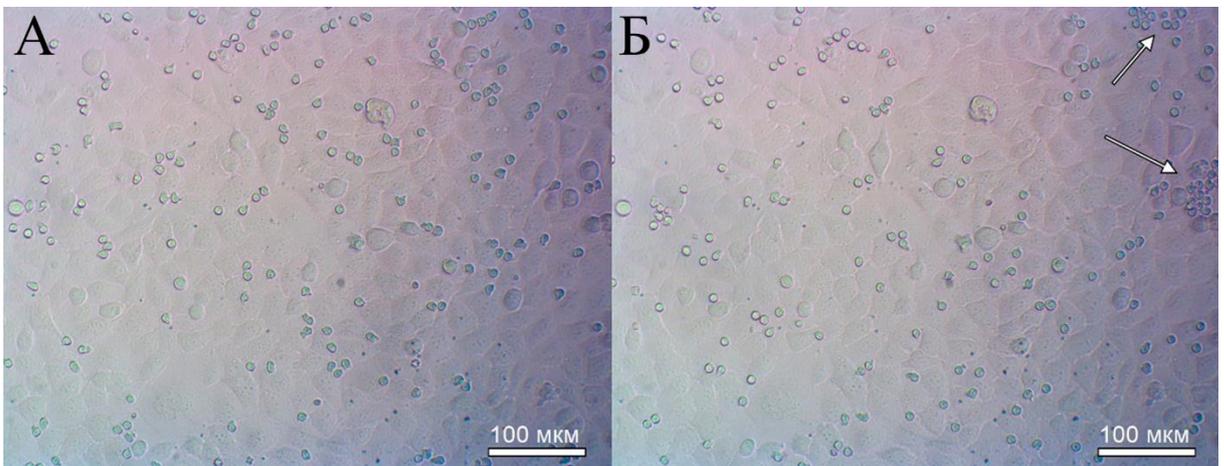


Рисунок 44 – Световая микроскопия нейтрофилов на эндотелиальных клетках в эксперименте с *E. faecalis* 645-p2 в качестве хемоаттрактанта перед ускорением тока жидкости до 20 мл /ч (А) и через 10 минут (Б) при токе жидкости 20 мл/ч. Стрелками указано формирование агрегатов нейтрофилов при сносе клеток потоком.

Было проведено количественное определение адгезировавших нейтрофилов, способных противостоять ускоренному потоку жидкости. Дополнительно были выполнены эксперименты при начальной скорости потока 20 мл/ч с целью оценки времени, необходимого клеткам для формирования плотной адгезии в системе (с учётом стандартного 10-минутного интервала для оседания нейтрофилов во всех экспериментах). Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Количество плотно адгезированных нейтрофилов, способных сопротивляться создаваемому току жидкости 20 мл/ч в проточной модели хемоаттракции с использованием различных бактериальных и биохимических хемоаттрактантов.

Эксперимент	Процент адгезированных нейтрофилов при ускорении тока жидкости до 20 мл/ч при наличии 30 минут на адгезию		Процент адгезированных нейтрофилов при ускорении тока жидкости до 20 мл/ч сразу
	Сразу ускорения	после 30 мин	
Контроль	96,30	92,59	67,37
<i>S.aureus</i> 2879M	90,68	47,03	16,41
<i>E.coli</i> 321	79,61	60,53	49,21
<i>P.mirabilis</i> 649-2	72,27	72,27	4,69
<i>E.faecalis</i> 645-p2	9,32	6,36	6,58
ФНО $\alpha$	50,35	27,97	13,73
LTV4	67,48	52,03	48,84
LXA4	42,11	20,39	9,68

Необходимо отметить, что максимальное количество плотно адгезированных нейтрофилов регистрировалось в контрольных экспериментах, что может быть обусловлено отсутствием их поляризации и миграционной активности. Ранее другими группами была продемонстрирована значительная адгезия нейтрофилов к эндотелиальным клеткам в условиях формирования потока среды [Allport et al., 2002; Kempers et al., 2021], однако 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 активирует адгезию, но не индуцирует клеточную поляризацию, хотя механизм этого процесса остаётся неясным. Следует также подчеркнуть, что практически все нейтрофилы в контрольных экспериментах сохраняли интактную округлую форму (рис. 43).

В экспериментах с хемоаттрактантами значительная часть клеток (1) отрывалась и переносилась потоком, (2) существенно изменяла морфологию при попытке противостоять гидродинамическому воздействию. При этом наблюдались различные паттерны потери адгезии в зависимости от типа аттрактанта. После ускорения потока жидкости до 20 мл/ч 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.

Исключение составили два бактериальных хемоаттрактанта, проявлявших особенности и в статичной модели. В случае использования *P.mirabilis* 649-2 в качестве хемоаттрактанта все плотно адгезировавшиеся нейтрофилы сохраняли контакт с поверхностью до конца эксперимента, что согласуется с данными статичной системы, где нейтрофилы демонстрировали максимальную адгезию именно к этому штамму. В случае использования *E.faecalis* 645-p2 в качестве хемоаттрактанта, где в статичной модели наблюдалась стохастическая миграция нейтрофилов в направлении от хемоаттрактанта, практически все клетки в проточной системе теряли контакт с эндотелиоцитами и легко уносились потоком, вероятно, вследствие того же механизма «дезориентации», описанного ранее в горизонтальной модели.

При отсутствии 30-минутного интервала для адгезии нейтрофилов к эндотелиоцитам в условиях слабого потока количество адгезировавшихся клеток снижалось по сравнению с основным экспериментом, однако сохранялось сходное соотношение между группами. Единственным исключением вновь оказался *P.mirabilis* 649-2: несмотря на максимальную адгезию при ускорении потока до 20 мл/ч через 30 минут, в условиях немедленного воздействия практически все клетки смывались с поверхности. Это позволяет предположить, что факторам патогенности *P.mirabilis* 649-2 требуется время для прохождения через диализную мембрану, однако в таком случае результаты должны были бы приближаться к контрольным, где, напротив, наблюдается максимальная адгезия.

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 45 А, Б). При миграции нейтрофилы часто образовывали агрегаты или кластеры из 2-3 клеток. В таких агрегатах наблюдались признаки межклеточной коммуникации (рис. 45 В).

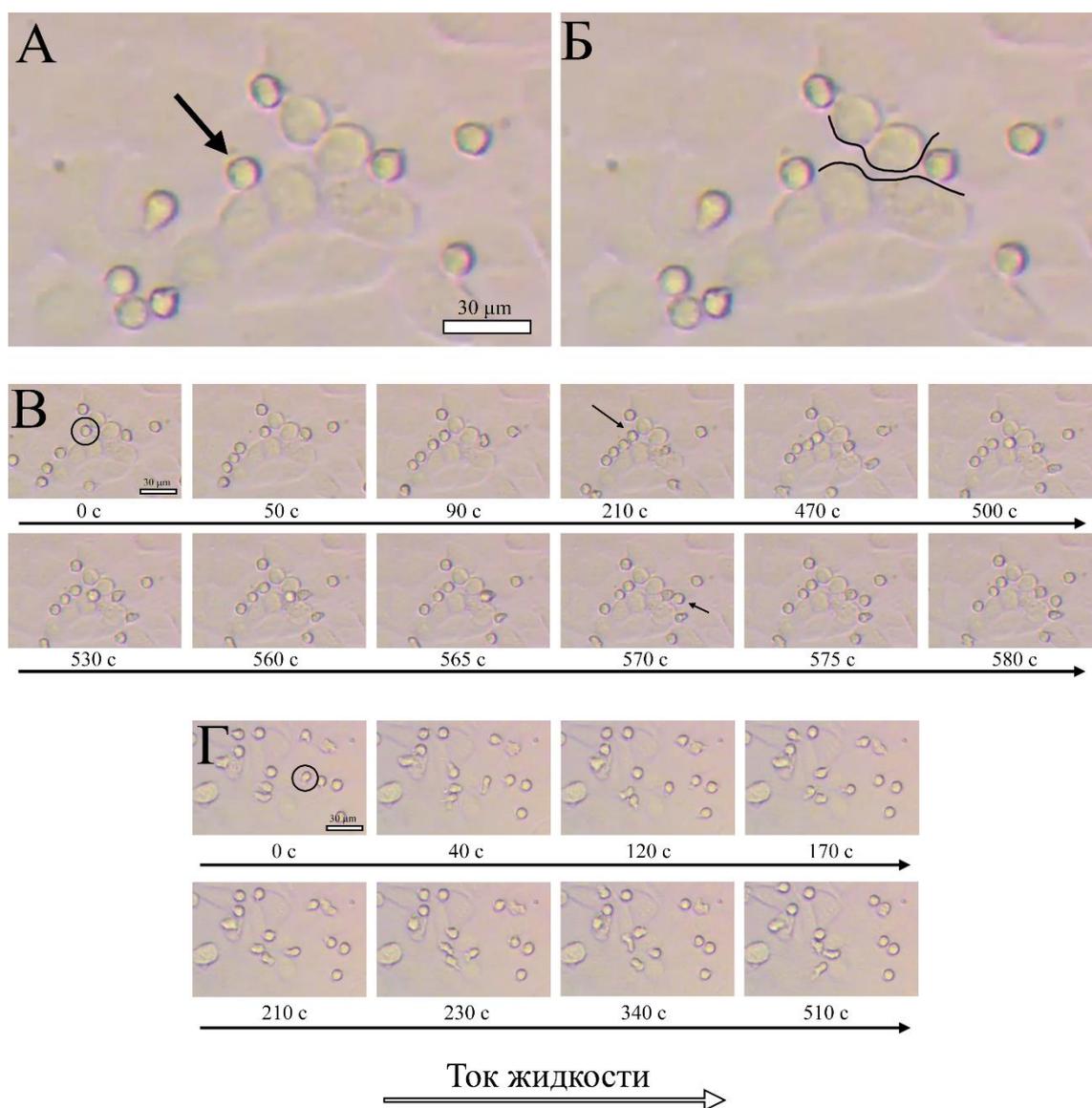


Рисунок 45 – Характер миграции нейтрофилов при скорости тока жидкости 1 мл/ч: (А) – переход нейтрофилов в маргинальный пул; (Б) – «направляющие» между эндотелиальными клетками; (В) – формирование нейтрофилами агрегатов в процессе движения через сформированные направляющие; (Г) – движение нейтрофила против капиллярного тока.

Введение бактериального хемоаттрактанта в контейнер существенно модифицировало коллективный характер гемодинамики и миграции нейтрофилов. Формирование агрегатов в отсутствие хемоаттрактанта постепенно нарастало со временем, однако статистически не превышало аналогичное в экспериментах с бактериями. В присутствии *S.aureus* 2879M, *E.faecalis* 645-p2 и *P.mirabilis* 649-2 наблюдались повышенные значения агрегации нейтрофилов (особенно у *S.aureus* 2879M), после чего вновь преобладала одиночная миграция клеток.

Формирование агрегатов в динамике также можно соотнести с их роением и самоусилением агрегации по принципу положительной обратной связи [Lammermann et al., 2013]. В литературе подобное явление в проточных моделях описано лишь однажды *in vivo* в мышинной модели. При инфекции *Candida albicans* наблюдалось формирование кластеров нейтрофилов 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, вероятно, за счёт десенсибилизации GPCR под действием LTB4 и CXCL2, секретируемых нейтрофилами в процессе миграции [Kienle et al., 2021]. В контрольных экспериментах при этом количество агрегатов оставалось на уровне плато без «разборки» и даже с небольшим увеличением склонности к кластеризации, вероятно из-за отсутствия поляризации и миграционной активности у непраймированных нейтрофилов.

При ускорении тока жидкости до уровня посткапиллярных венул (20 мл/ч) были зарегистрированы так называемые «нейтрофильные привязи» [Cugno et al., 2021] (рис. 46) – цитоплазматические структуры, отвечающие за торможение нейтрофила в кровотоке для реализации последующего диапедеза [Marki et al.,

2018]. За счет «привязей» нейтрофилы мигрировали против тока жидкости скоростью 20 мл/ч (рис. 47).

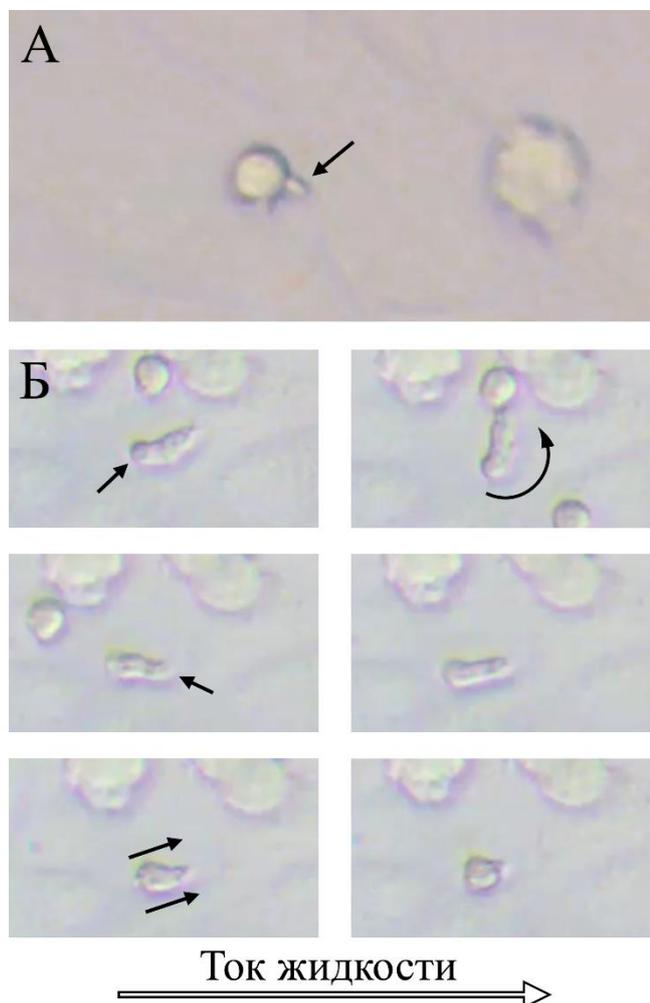


Рисунок 46 – Образование «привязей» нейтрофилом, удерживающих клетки в потоке жидкости: (А) – формирование прочной связи с эндотелиоцитом с вытягиванием клетки и ее удержанием от движения в потоке; привязь помечена стрелкой; (Б) – удержание клетки за счет «привязи», разворот, движение против тока жидкости по хемотаксическому градиенту.

Было подсчитано количество привязей, образующихся за 60 минут при внесении различных бактериальных штаммов (рис. 48). Внесение в систему любой бактерии увеличивало образование привязей, но только внесение *S.aureus* 2879M и *P.mirabilis* 649-2 вызывало статистически значимые изменения. Эти же бактерии провоцировали наиболее направленную миграцию нейтрофилов в горизонтальной модели.

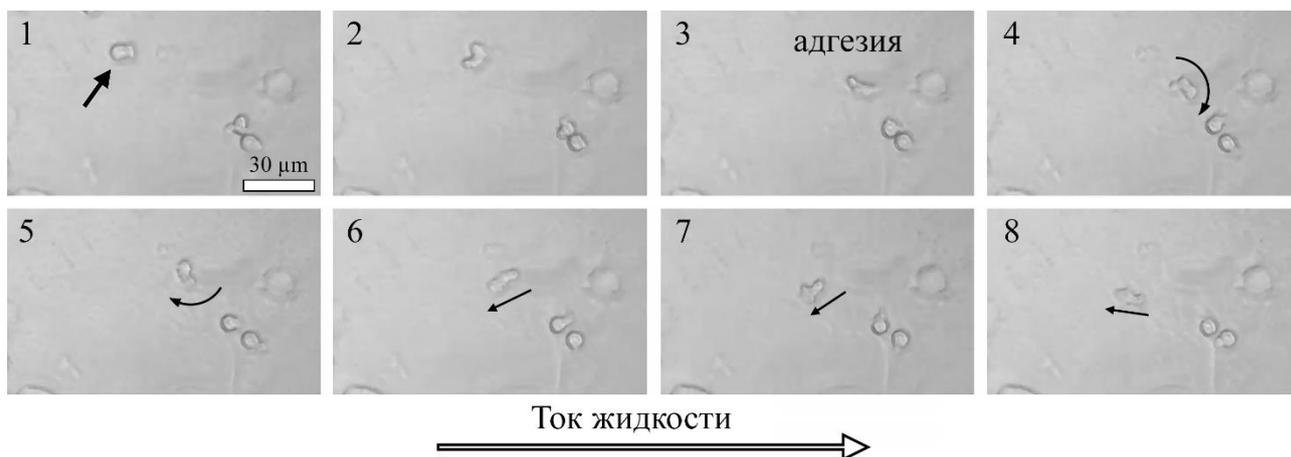


Рисунок 47 – Динамика формирования «привязей» нейтрофилами в условиях тока жидкости со скоростью 20 мл/ч, имитирующего венулу. Переход нейтрофилов в маргинальный пул, адгезия на эндотелии, разворот клетки против направления тока жидкости за счёт формирования «привязи» и миграция против тока жидкости по градиенту хемоаттракции, создаваемому *E.coli* 321.

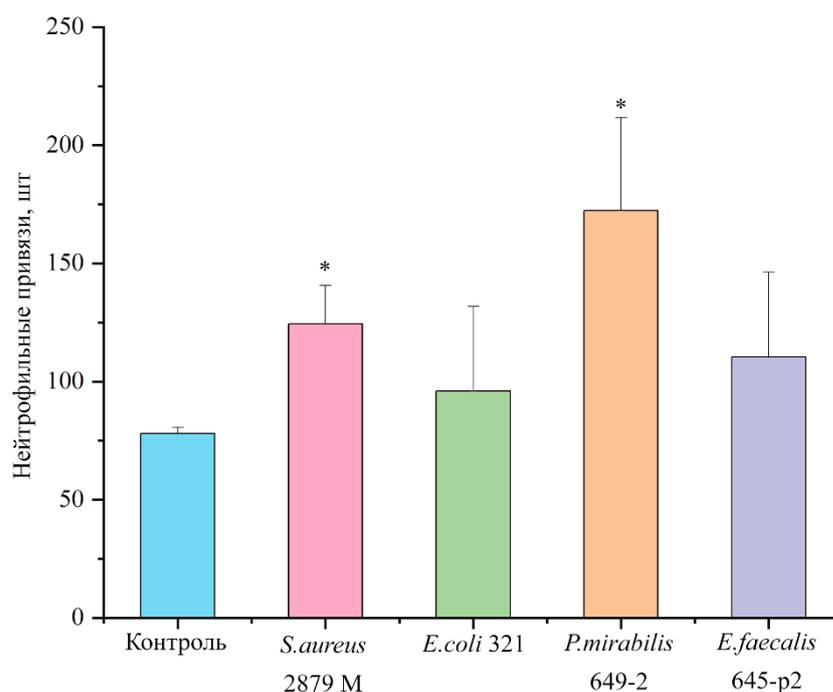


Рисунок 48 – Количество «привязей», формируемых нейтрофилами в процессе миграции по градиенту, создаваемому различными бактериальными хемоаттрактантами (\* – различия с контролем статистически значимы  $p < 0,05$ ; t-test;  $n = 5$ ).

### 3.4 Определение биологических анализов в клетках наноамперометрическим методом для выявления их активации

Поскольку было установлено взаимодействие между клетками в системе (нейтрофилами, эндотелиоцитами, бактериями) и активация эукариотических клеток при бактериемии, выражаемая в продукции активных форм кислорода, на следующем этапе был количественно определена продукция АФК при таких взаимодействиях.

Несмотря на многочисленные преимущества широко используемых флуоресцентных методов, они имеют ряд недостатков, в первую очередь, сложность измерения сигнала от отдельной клетки с высоким временным разрешением. Использование наноамперометрического метода позволило локально определять продукцию АФК в единичных клетках, контролируя момент межклеточного контакта [Vaneev et al., 2020].

#### 3.4.1 Определение АФК в единичных нейтрофилах для измерения их активации при взаимодействии с бактериями

Регистрация хроноамперограммы контрольного нейтрофила без бактериального воздействия представлена на рисунке 49. Присутствуют локальные спайки, однако значительная продукция АФК в течение наблюдения отсутствует.

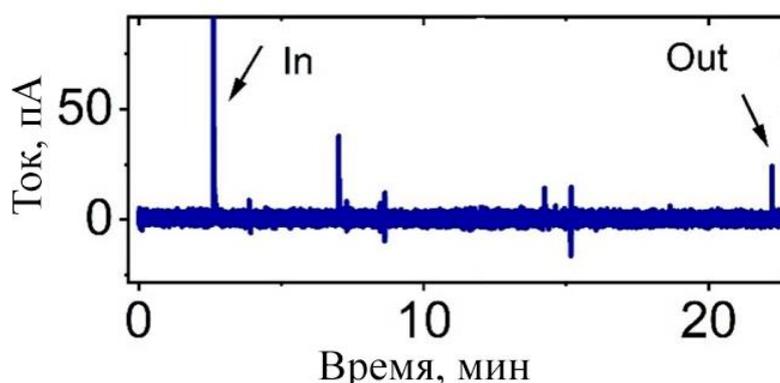


Рисунок 49 – Контрольная хроноамперограмма, отражающая отсутствие значительных пиков продукции АФК в интактном нейтрофиле.

После введения зонда в нейтрофил и добавления грамотрицательной *E.coli* 321 (рис. 50) или грамположительного *S.aureus* 2879М (рис. 51) наблюдались спайки, отражающие продукцию АФК.

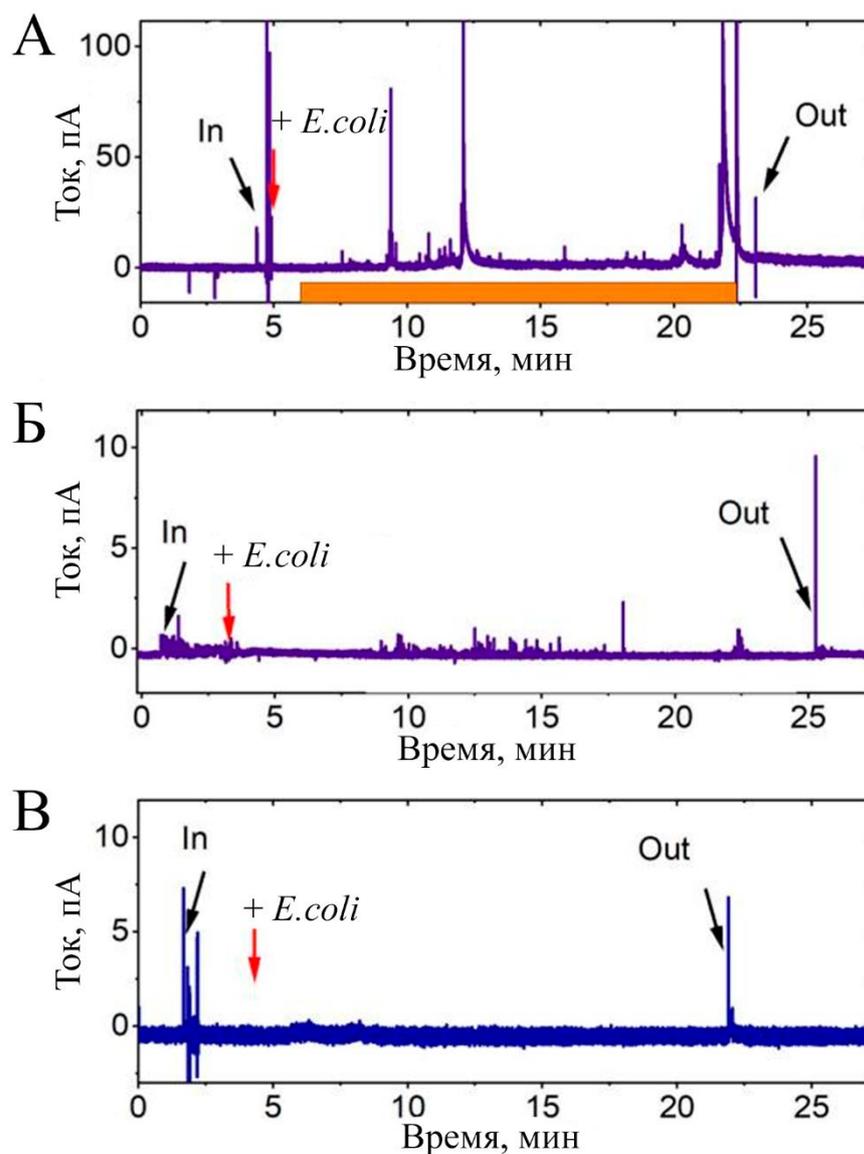


Рисунок 50 – Продукция АФК нейтрофилами при стимуляции *E.coli* 321. Красной стрелкой показано внесение бактерии. Оранжевым цветом обозначены интервалы с активной генерацией АФК. (А) – сильная реакция нейтрофила на *E.coli*; (Б) – слабая реакция нейтрофила на *E.coli*; (В) – реакция нейтрофила на бактериальную стимуляцию отсутствует.

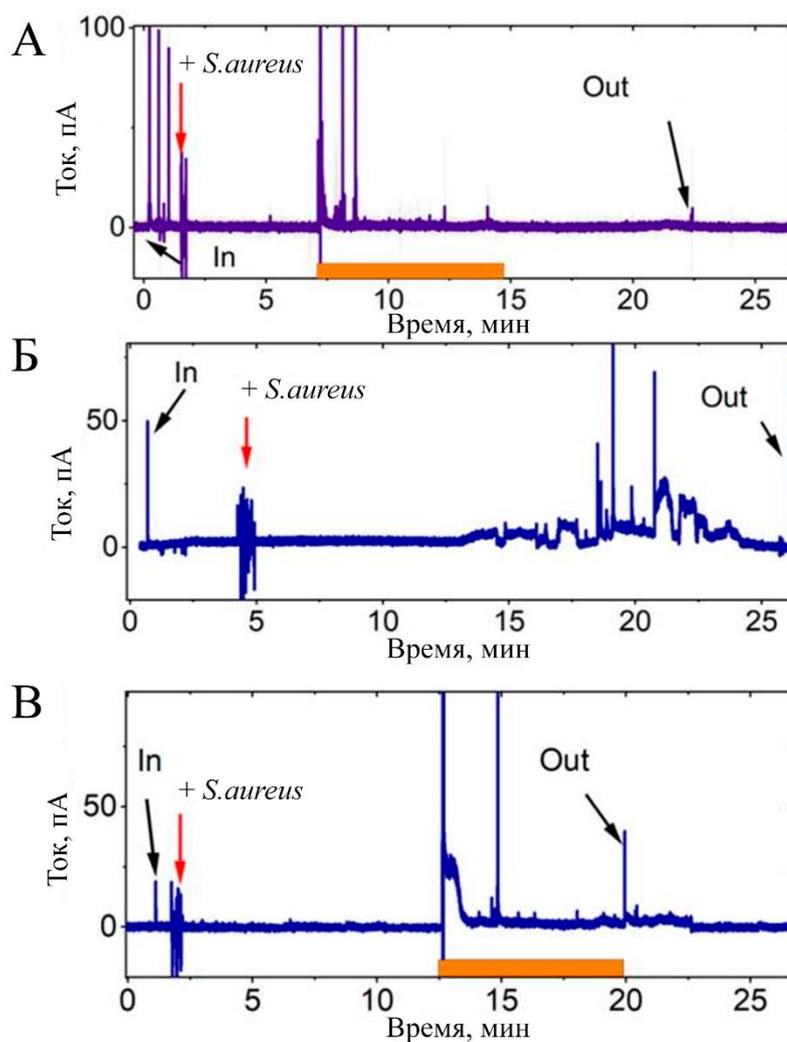


Рисунок 50 – Продукция АФК нейтрофилами при стимуляции *S.aureus* 2879М. Красной стрелкой показано внесение бактерии. Оранжевым цветом обозначены интервалы с активной генерацией АФК. (А) – сильная реакция нейтрофила на *S.aureus*; (Б) – сильная, но замедленная реакция нейтрофила на *S.aureus*; (В) – замедленная реакция нейтрофила на *S.aureus*.

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*, также был интенсивнее (рис. 52).

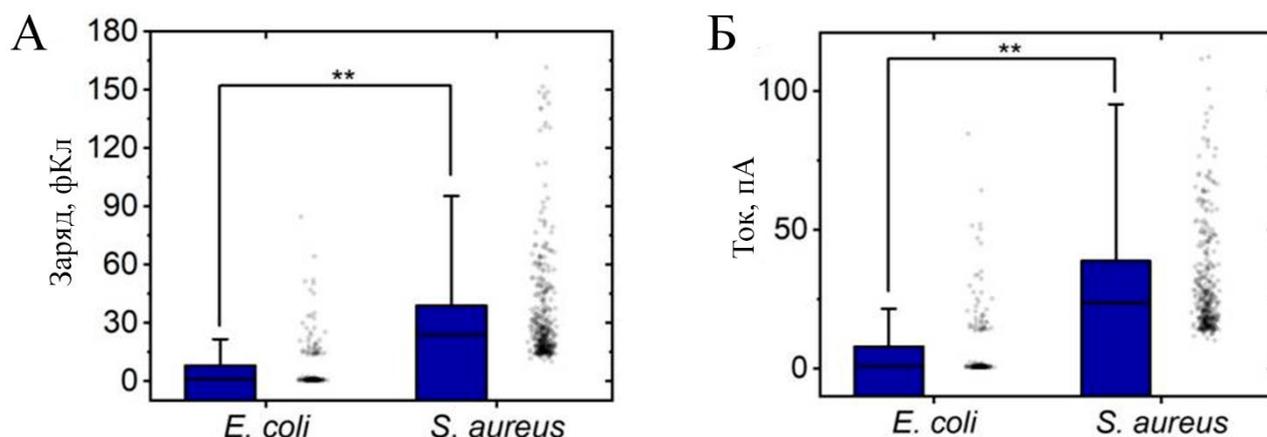


Рисунок 52 – Сравнение продукции АФК в нейтрофилах при стимуляции бактериями *E.coli* 321 и *S.aureus* 2879М. (А) – средняя площадь под кривой пика; (Б) – средняя амплитуда пика. (Количество пиков для *E.coli* (n = 166), *S.aureus* (n = 392), \*\* – различия статистически значимы,  $p < 0,001$ ; критерий ANOVA).

Более высокая активность образования АФК в нейтрофилах в ответ на *S.aureus* по сравнению с *E.coli* может быть объяснена несколькими факторами. Во-первых, *S.aureus* вызывает более выраженную экспрессию АФК в нейтрофилах [Gupta et al., 2022]. Во-вторых, механизмы первичного связывания между нейтрофилами и *S.aureus* или *E.coli* через толл-подобные рецепторы различны. *S.aureus* напрямую связывается с TLR-2 благодаря присутствию липотейхоевых кислот и пептидогликанов, в то время как *E.coli* имеет более сложный механизм взаимодействия с TLR-4, через связывающий белок и CD14. Нейтрофилы реже экспрессируют CD14 в сравнении с моноцитами, поэтому взаимодействие менее выражено [Hadley et al., 2005]. 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 различно отражается на клеточной активации.

### 3.4.2 Активация нейтрофилов и эндотелиального слоя при взаимодействии между собой

Следующей стадией эксперимента стала оценка воздействия праймированных бактериями нейтрофилов на продукцию АФК/АФА в клетках эндотелия после контакта с нейтрофилами, поскольку активация эндотелия отвечает за сигналинг в процессе трансэндотелиальной миграции [Riddle et al., 2022]. На рис. 53 представлен процесс введения наноэлектрода в эндотелиоцит в контроле (А) и в эксперименте с внесенными нейтрофилами (Б).

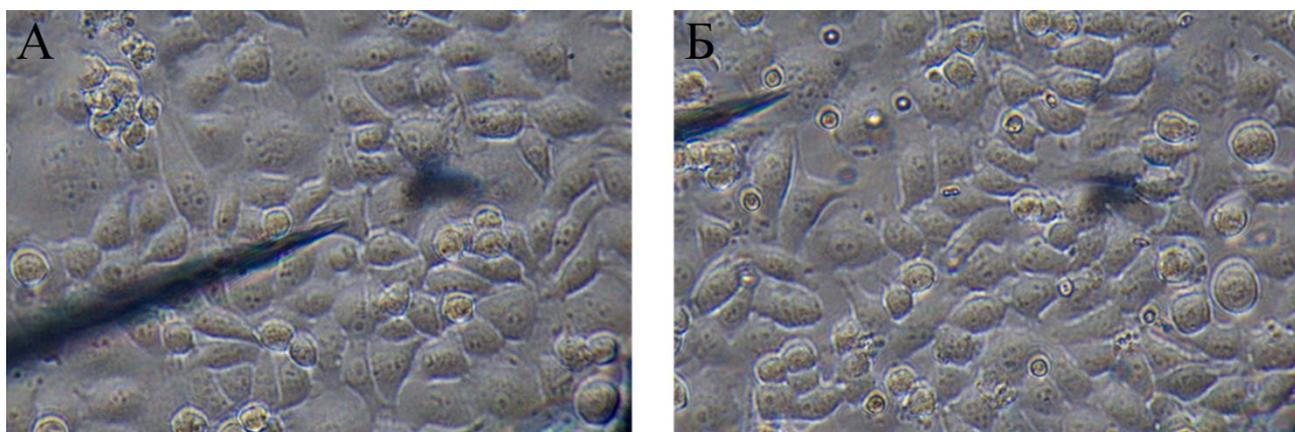


Рисунок 53 – Оптическая микроскопия монослоя EA.hy926 при анализе продукции АФК/АФА. (А) – монослой клеток EA.hy926 до воздействия нейтрофилов; (Б) – монослой эндотелиальных клеток с внесенными нейтрофилами.

На рис. 54 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. Вероятно, это связано с истощением функциональных резервов нейтрофилов в процессе праймирования:

фагоцитоз – энергозависимый процесс, сопровождающийся дегрануляцией, что снижает способность клеток активировать эндотелий после прединкубации.

Однако одновременное внесение в систему бактерий и нейтрофилов вызывало статистически значимое увеличение продукции АФК/АФА эндотелиоцитами. Это может быть следствием (1) альтерации эндотелия под воздействием бактериальных факторов; (2) воздействия АФК и ферментов, высвобождаемых нейтрофилами в процессе фагоцитоза. При добавлении *S.aureus* 2879М продукция метаболитов была выше, чем при добавлении *E.coli* 321.

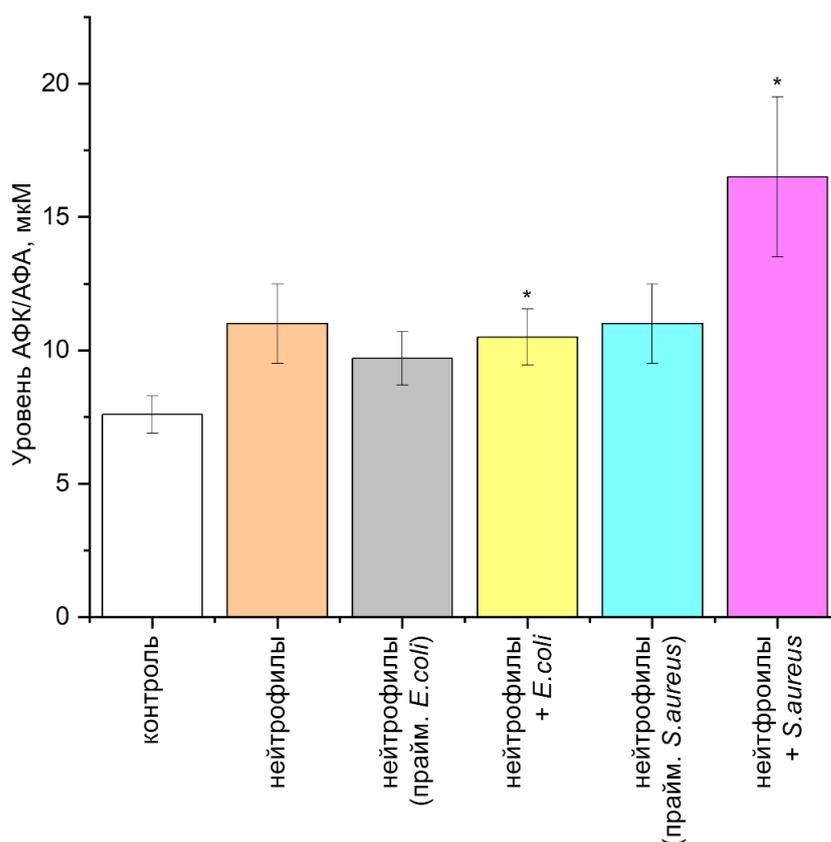


Рисунок 54 – Уровень продукции АФК/АФА эндотелиальными клетками EA.hy926 при отсутствии воздействия, при внесении интактных нейтрофилов (физиологическая ситуация), при внесении праймированных *E.coli* 321 или *S.aureus* 2879М нейтрофилов, и при последовательном внесении нейтрофилов и бактерий (\* – различия с контролем статистически значимы,  $p < 0,05$ ; t-test).

Однако в процессе эксперимента было замечено, что эндотелиоциты, проконтактировавшие с разным количеством нейтрофилов, в различном объеме

продуцировали АФК/АФА. Таким образом было принято решение помимо средней продукции АФК/АФА среди всех эндотелиоцитов также подсчитать продукцию при взаимодействии с разным количеством нейтрофилов. По результатам подсчета выявилось, что активация носила накопительный характер (рис. 55). В случае адгезионного взаимодействия эндотелиальной клетки не с одним, а с двумя нейтрофилами наблюдалось статистически значимое увеличение продукции АФК (с уровня 10,9 мкМ при контакте одного нейтрофила с эндотелиальной клеткой до уровня 13,7 мкМ при взаимодействии с двумя). Дальнейшие контакты с тремя или четырьмя нейтрофилами влияли на эндотелиоцит незначительно, и система достигала насыщения при среднем уровне максимальной продукции метаболитов около 15-20 мкМ, что можно считать пиковой продукцией АФК/АФА одним эндотелиоцитом.

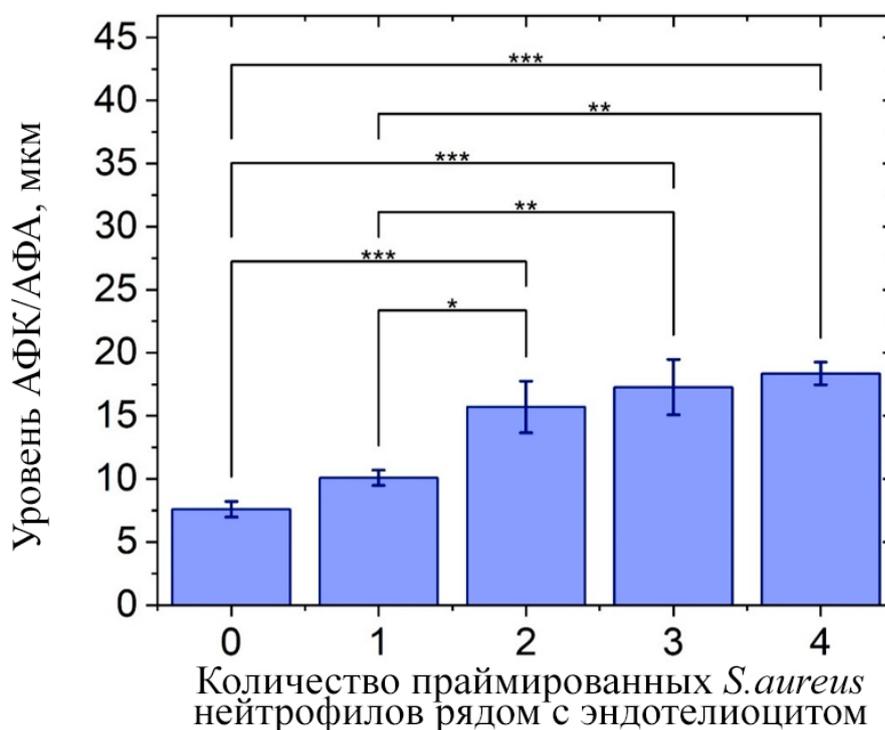


Рисунок 55 – Уровни продукции АФК в эндотелиальных клетках при контакте с различным количеством праймированных нейтрофилов (различия статистически значимы \*\*\* –  $p < 0,001$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \* –  $p < 0,05$ ; критерий ANOVA).

Такая реакция эндотелия может быть объяснена адаптационным механизмом, снижающим шанс возможность активации при случайных единичных межклеточных контактах. Лишь при наличии значительного количества нейтрофилов в области происходит непосредственная 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 микроманипулятор для переноса нейтрофила из одной области в другую с непрерывным измерением продукции АФК внутри клетки.

В случае контакта непраймированного нейтрофила с эндотелиоцитом не наблюдалось спайков тока, свидетельствующих об увеличении уровня продукции АФК (рис. 56).

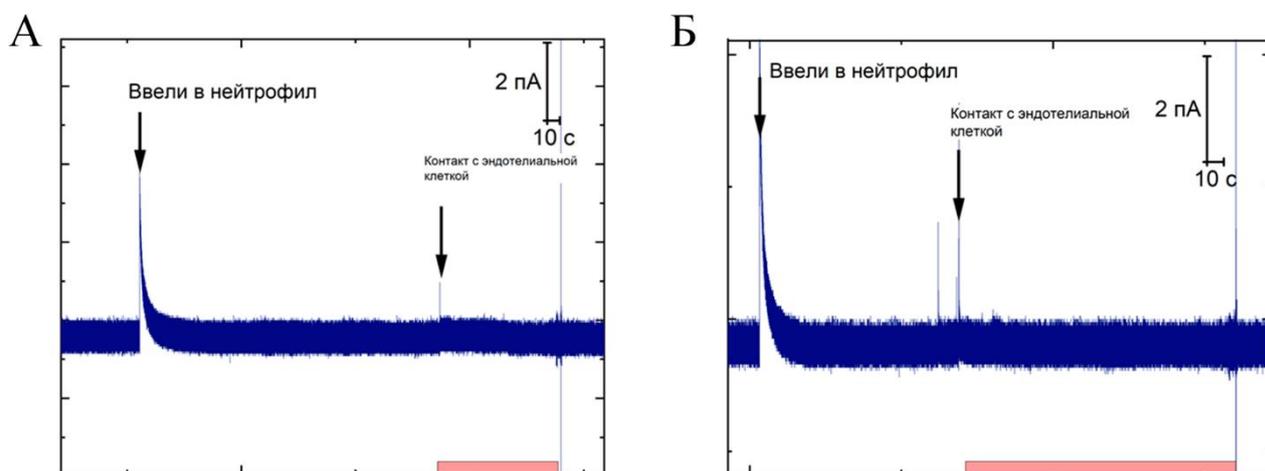


Рисунок 56 – Хроноамперограммы, полученные при введении наноэлектрода в нейтрофил с последующим контактом непраймированного нейтрофила с эндотелиальной клеткой EA.hy926. У контрольных нейтрофилов изначально обнаруживается низкая продукция АФК при введении электрода (спайки величиной 2-5 пА).

Предварительно праймированные нейтрофилы имели более высокий контрольный уровень продукции АФК (спайки величиной 15-30 пА) при введении в них зонда. При подведении праймированного *S.aureus* нейтрофила к монослою эндотелиальных клеток бала зарегистрирована сверхпродукция АФК, наблюдаемая в течение приблизительно 30 секунд (рис. 57 А, Б). В случае праймирования нейтрофилов грамотрицательными *E.coli* наблюдали схожую реакцию, но спайки были менее выражены (рис. 57 В, Г).

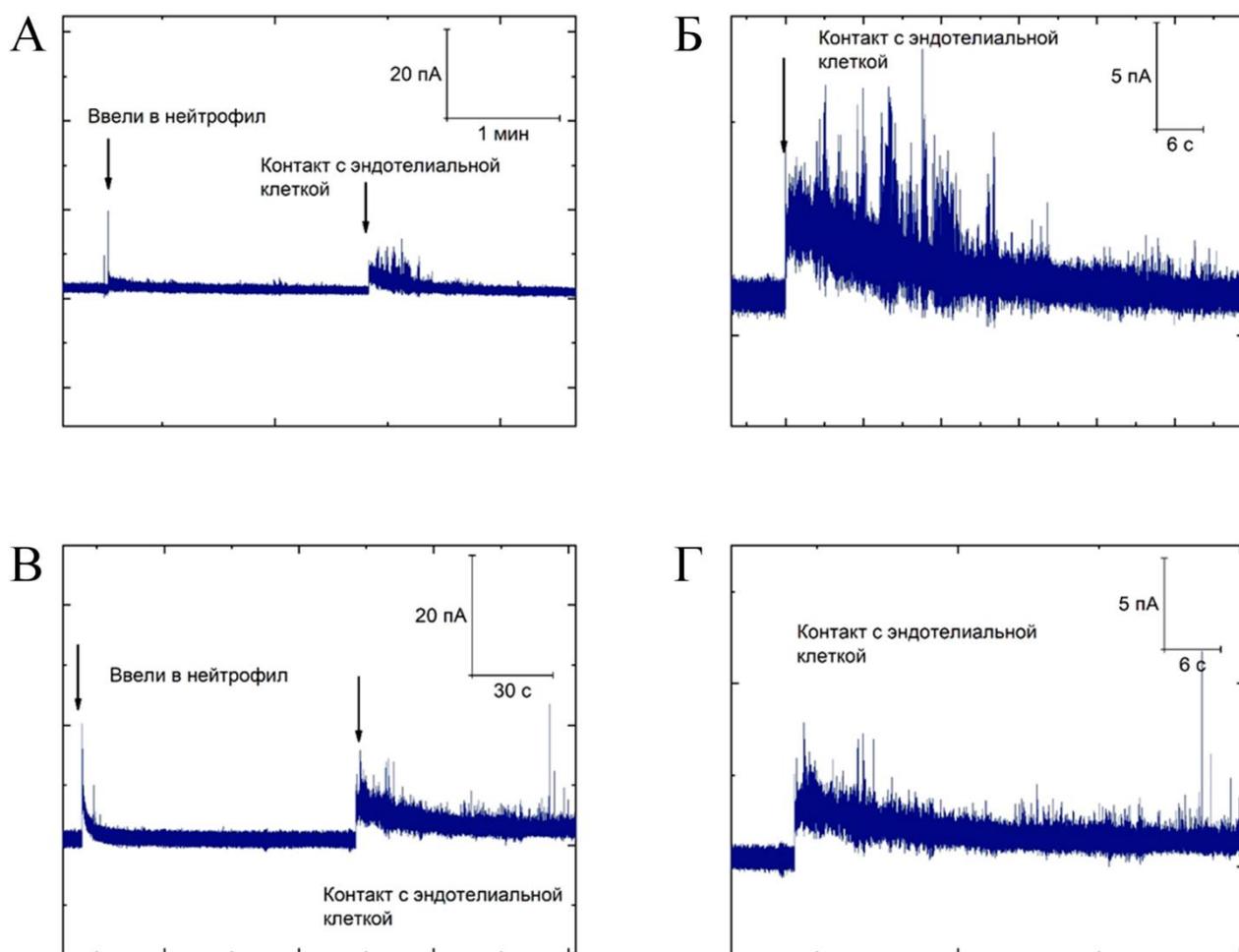


Рисунок 57 – Хроноамперограммы, полученные при контакте праймированных нейтрофилов с эндотелиальной клеткой. (А-Б) праймирование *S.aureus* 2879М, (В-Г) праймирование *E.coli* 321.

Спайки формировались исключительно при контакте праймированных нейтрофилов (инкубированных с бактериальными штаммами) 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* выражен сильнее и статистически значимо отличен от контроля, тогда как различия между нейтрофилами, активированными *E.coli*, не достигают статистической значимости при сходной тенденции (рис. 58). Это соотносится с активацией самих нейтрофилов бактериями, где *S.aureus* вызывал большую 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.

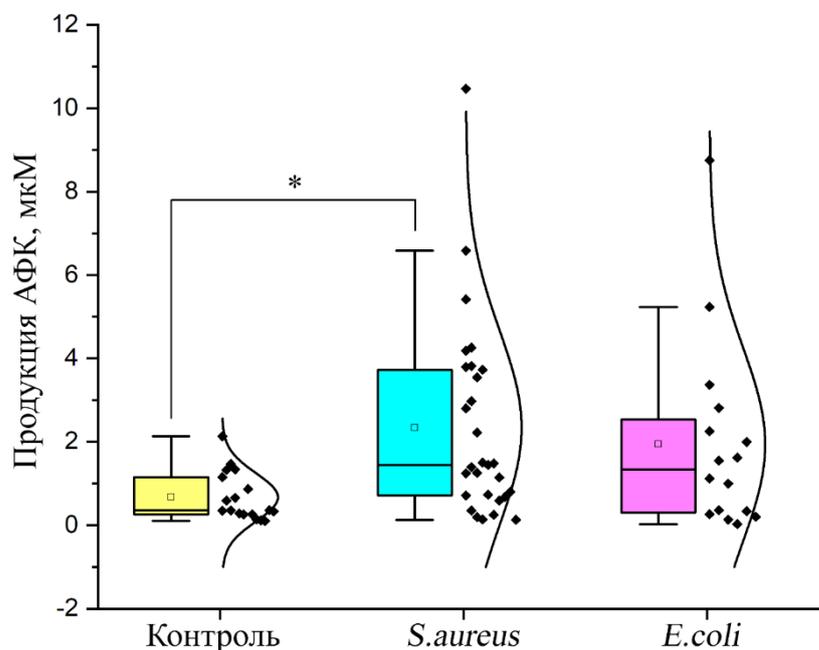


Рисунок 58 – Средний внутриклеточный уровень АФК в нейтрофилах, праймированных *S.aureus* 2879M и *E.coli* 321, после контакта с эндотелиальной клеткой (\* – различия с контролем статистически значимы,  $p < 0,05$ ; U-test).

### 3.5 Популяционная активность продукции АФК нейтрофилами при миграции

Поскольку нейтрофилы в горизонтальной модели продемонстрировали качественную продукцию АФК при миграции по хемотаксическому градиенту, было необходимо количественно определить популяционный ответ на хемоаттрактант. Аналогично миграционным показателям сравнивали активацию нейтрофилов в системе с эндотелием и полимерным субстратом. Светосумма, выраженная в относительных единицах (MFI – *mean fluorescence intensity*) представлена на рис. 59 (миграция по полимерному субстрату) и 60 (миграция по монослою эндотелиоцитов).

Активация нейтрофилов, оцениваемая по уровню продукции АФК, регистрировалась сразу после внесения клеток в среду, содержащую хемоаттрактанты, независимо от типа подложки – будь то полимер или эндотелиальный монослой. Однако дальнейшая динамика продукции АФК существенно различалась в зависимости от условий эксперимента.

На пластиковом субстрате наиболее интенсивная продукция АФК наблюдалась в контрольной группе, где отсутствовал градиент хемоаттрактанта. Уже через 30 минут уровень АФК в контроле превышал показатели мигрирующих по градиенту нейтрофилов, достигая своего максимума к 60-й минуте наблюдения и статистически значимо опережая все экспериментальные группы. В экспериментах с эндотелиальным монослоем контрольная группа, напротив, демонстрировала статистически значимо более низкую продукцию АФК по сравнению со всеми экспериментальными группами на протяжении всего исследования, за исключением группы, где в качестве хемоаттрактанта использовался *P.mirabilis*.

Сравнительный анализ показал, что продукция АФК при хемоаттракции также зависела от типа подложки (табл. 6). На культуральном пластике уровень продукции АФК при миграции по бактериальному градиенту был статистически выше, чем на эндотелиальном монослое. Среди биохимических хемоаттрактантов снижение продукции АФК наблюдалось только для ЛТВ4,

тогда как для LXA4 и ФНО $\alpha$  уровни оставались сопоставимыми на обоих типах подложек.

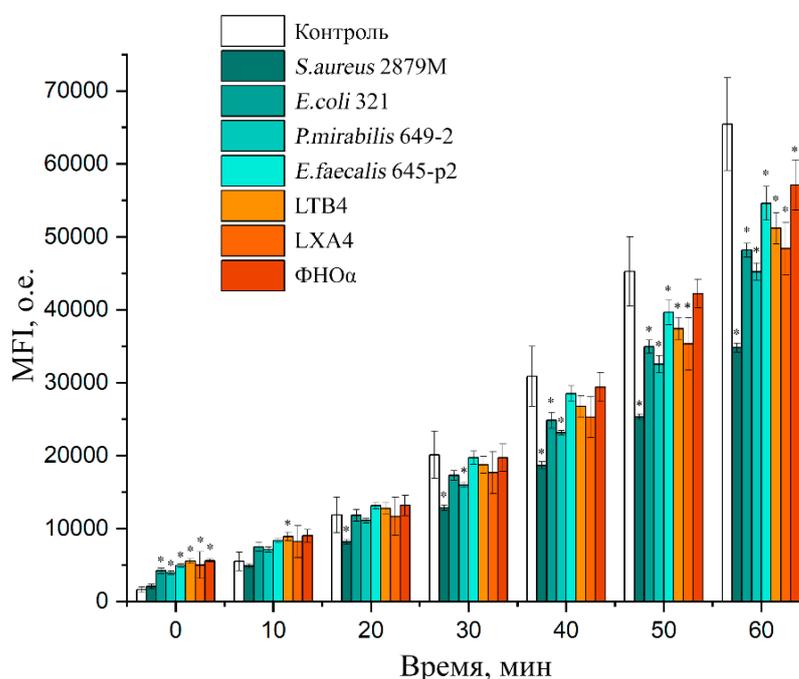


Рисунок 59 – Динамика продукции АФК нейтрофилами, мигрирующими по культуральному пластику (\* – различия между контрольной и экспериментальной группами статистически значимы,  $p < 0,05$ ; t-test;  $n = 5$ ).

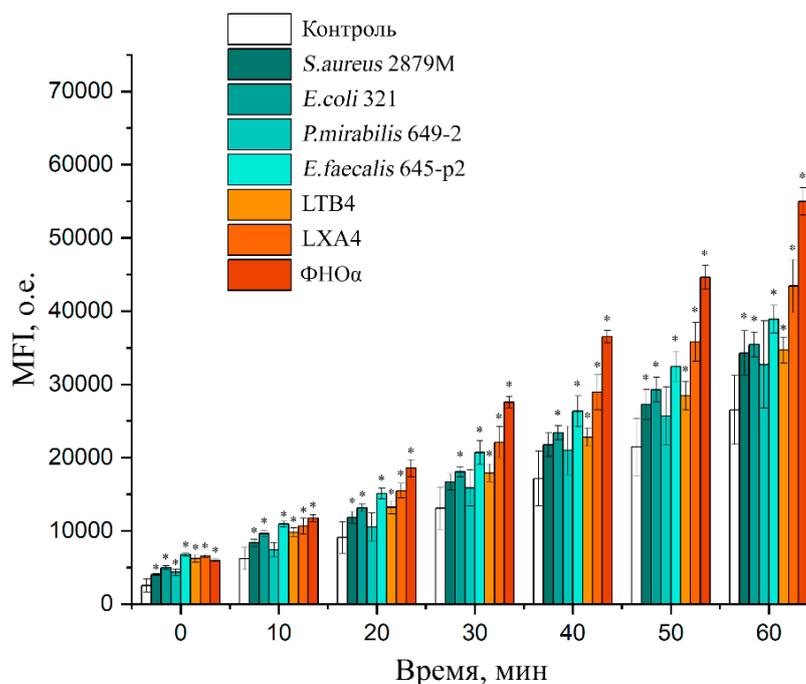


Рисунок 60 – Динамика продукции АФК нейтрофилами, мигрирующими по культуральному пластику (\* – различия между контрольной и экспериментальной группами статистически значимы,  $p < 0,05$ ; t-test;  $n = 5$ ).

Таблица 6 – Светосумма в конце эксперимента в контрольной и экспериментальной группах на поверхности пластика и эндотелиального монослоя.

Светосумма через 60 мин инкубации, о.е.	Контроль	<i>S.aureus</i> 2879M	<i>E.coli</i> 321	<i>P.mirabilis</i> 649-2	<i>E.faecalis</i> 645-p2	ЛТВ4	LXA4	ФНО $\alpha$
На культуральном пластике	65451,0 ± 6376,1	34798,8 ± 627,8	48163,0 ± 944,7	45223,5 ± 1177,8	54593,0 ± 2313,9	51180,8 ± 2148,5	48391,2 ± 3604,3	57087,5 ± 3439,6
На эндотелии EA.hy926	26515,8 ± 4716,6*	34277,8 ± 3037,2	35451,0 ± 1678,9*	32706,7 ± 5969,1*	38882,0 ± 1912,8*	34679,7 ± 1759,2*	43431,8 ± 3622,9	54969,3 ± 1859,6

\* – различия в АФК-продукции нейтрофилов на бесклеточной поверхности и поверхности с эндотелиальным монослоем статистически значимы,  $p < 0,05$ ; t-test;  $n = 5$ .

Одной из ключевых причин различий в поведении нейтрофилов на поверхности эндотелиальных клеток и культурального пластика, вероятно, является изменение их метаболизма и функционального состояния. Нейтрофилы в контрольных условиях на пластиковой поверхности преимущественно реализовывали адгезионный, а не миграционный потенциал, при этом предположительно расходуя максимальное количество энергии. Значительная часть энергетических ресурсов, судя по всему, направлялась на поддержание адгезии и продукцию АФК. В присутствии эндотелиальных клеток неспецифическая адгезионная активация нейтрофилов не наблюдалась, тогда как взаимодействие с молекулами адгезии эндотелиоцитов могло подавлять продукцию АФК [Zhao et al., 2003].

Увеличение продукции АФК нейтрофилами 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, что подтверждается данными, представленными в

разделе 3.4.2. На культуральном пластике наличие хемоаттрактанта, напротив, препятствовало неспецифической адгезии, снижая продукцию АФК относительно контроля и переключая клетки на промиграционный фенотип [Schwartz et al., 2024].

Среди бактериальных хемоаттрактантов только *P.mirabilis* не вызвал увеличения продукции АФК нейтрофилами в присутствии эндотелия, что согласуется с предыдущими данными о подавлении этим штаммом миграционной активности нейтрофилов. Наиболее выраженную стимуляцию продукции АФК продемонстрировал ФНО $\alpha$  – классический индуктор оксидативного стресса [Kikuchi-Ueda et al., 2013]. Сравнение результатов продукции АФК с данными о миграционной активности нейтрофилов позволяет предположить, что биохимические хемоаттрактанты способны активировать клетки, вызывая сверхпродукцию АФК, но недостаточны для индукции направленной миграции.

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 диализными мембранами. 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.

### **3.6 Энергетика нейтрофилов в миграционном процессе**

Сравнивая разницу в продукции АФК и миграционной активности нейтрофилов на пластиковом субстрате и на эндотелиальных клетках было важно понять энергетику процесса миграции, а также попытаться определить будет ли характер аттрактанта вносить коррекцию в энергетический метаболизм клетки.

Также известно, что нарушение метаболизма гликогена негативно сказывается на подвижности нейтрофилов и эффективности фагоцитоза [Couper et al., 1991]. Поскольку при использовании исключительно биохимических факторов миграции (ЛТВ4, LXA4, ФНО $\alpha$ ) наблюдалось статистически значимое снижение пройденного клетками пути и отсутствие направленности движения (раздел 3.2.1), также было интересно понять, связано ли отсутствие движения с адгезионными процессами.

Однако полученные данные экспериментов показали (рис. 61), 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 and Sanz, 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 отличие от этого, на бесклеточной поверхности нейтрофилы расходуют статистически значимо большее количество гликогена и энергии, затрачивая её на неспецифическую адгезию и перестройки цитоскелета.

Интересно, что в случае использования бактериального хемоаттрактанта, вызывавшего активное движение нейтрофила на эндотелии (*S.aureus*, *E.coli*, *E.faecalis*), расход гликогена нейтрофилами, адгезирующимися на культуральном пластике статистически значимо снижался относительно контроля, что могло быть обусловлено более слабой адгезией нейтрофилов к поверхности для облегчения миграции или переключением метаболизма с целью сохранить энергию АТФ для последующего фагоцитоза бактерий. Отсутствие такой динамики в экспериментах с *P.mirabilis* могло быть обусловлено меньшим количеством активно мигрирующих клеток на бесклеточной поверхности, поэтому наблюдалась лишь тенденция к снижению расхода гликогена. Также наблюдали лишь тенденцию к снижению расхода гликогена в экспериментах с

LTB4 и LXA4, что согласуется со стохастическим движением нейтрофилов в этих экспериментах.

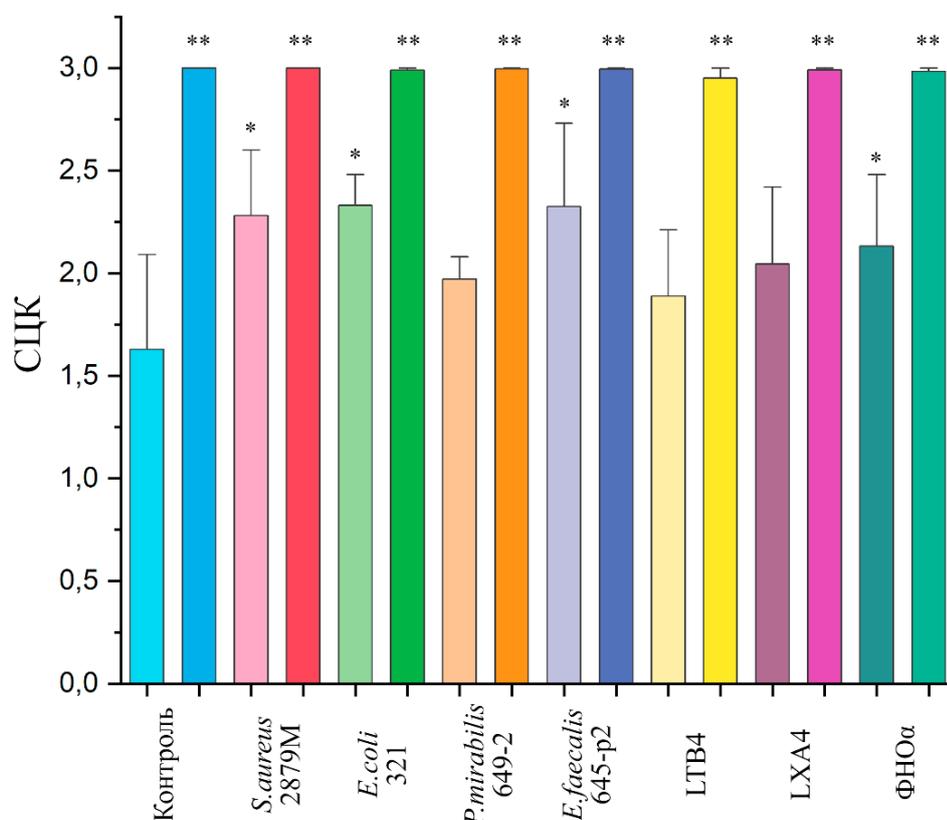


Рисунок 61 – Содержание гликогена в нейтрофилах, выраженное через средний цитохимический коэффициент. Эксперименты с различными аттрактантами разбиты по парам: левый столбец – эксперименты на бесклеточной поверхности, правый столбец – эксперименты на поверхности эндотелиоцитов (\* – различия с контролем статистически значимы,  $p < 0,05$ ; t-test; \*\* – различия с бесклеточной поверхностью статистически значимы,  $p < 0,05$ ; U-test;  $n = 5$ ).

Для проверки гипотезы о том, что нейтрофилы облегчают свою подвижность за счёт снижения адгезии и уменьшения энергетических затрат на этот процесс, в экспериментах на бесклеточной поверхности был проведён дополнительный подсчёт колебаний адгезированных нейтрофилов на чашке Петри в начале и в конце (через 60 минут) эксперимента. Полученные данные представлены на рис. 62.

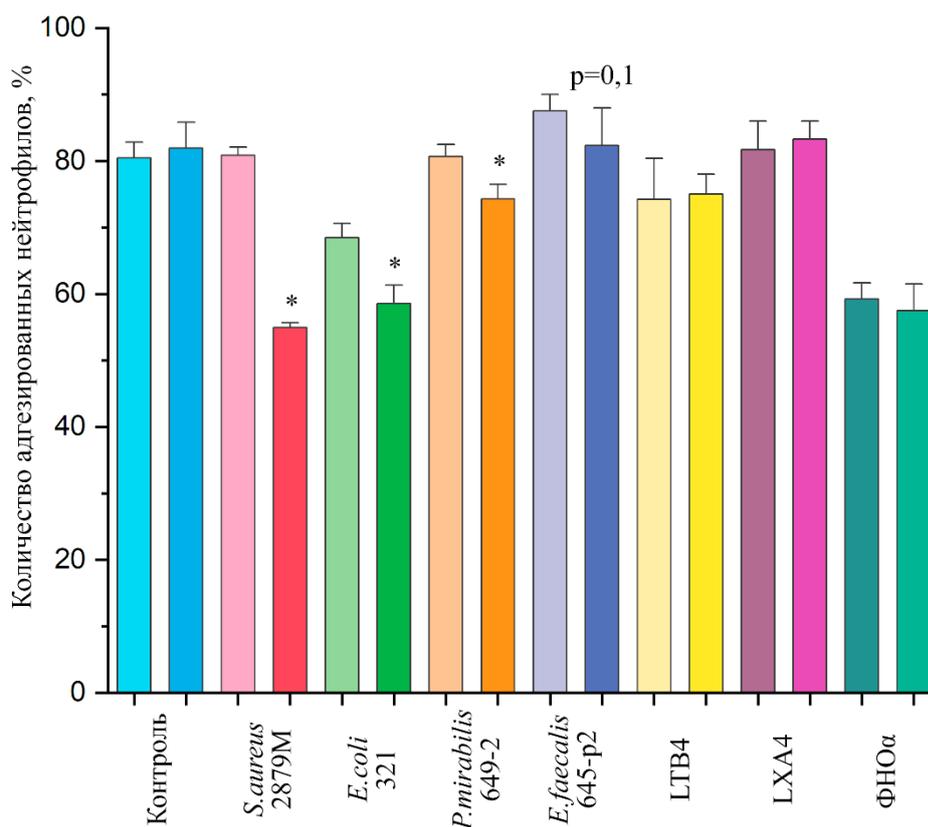


Рисунок 62 – Количество адгезированных нейтрофилов на бесклеточной поверхности чашки Петри под влиянием различных хемоаттрактантов на начало и конец эксперимента. Эксперименты с различными хемоаттрактантами разбиты по парам: левый столбец – начало эксперимента, правый столбец – спустя 60 минут инкубации (\* – различия с началом эксперимента статистически значимы,  $p < 0,05$ ; t-test;  $n = 5$ ).

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

Переключение метаболизма нейтрофилов при движении по хемотаксическому градиенту также подтверждается наблюдениями клеточной гибели по механизму нетоза в экспериментах с бактериальными аттрактантами, независимо от типа используемой поверхности. Например, на рис. 63 представлены нейтрофилы, обнаруженные в контрольных экспериментах и экспериментах со *S.aureus* 2879М в качестве хемоаттрактанта: в контрольных мазках практически все клетки сохраняли правильную форму (рис. 63 А, В), тогда как в присутствии бактерии в мазках регистрировался нетоз (рис. 63 Б, Г).

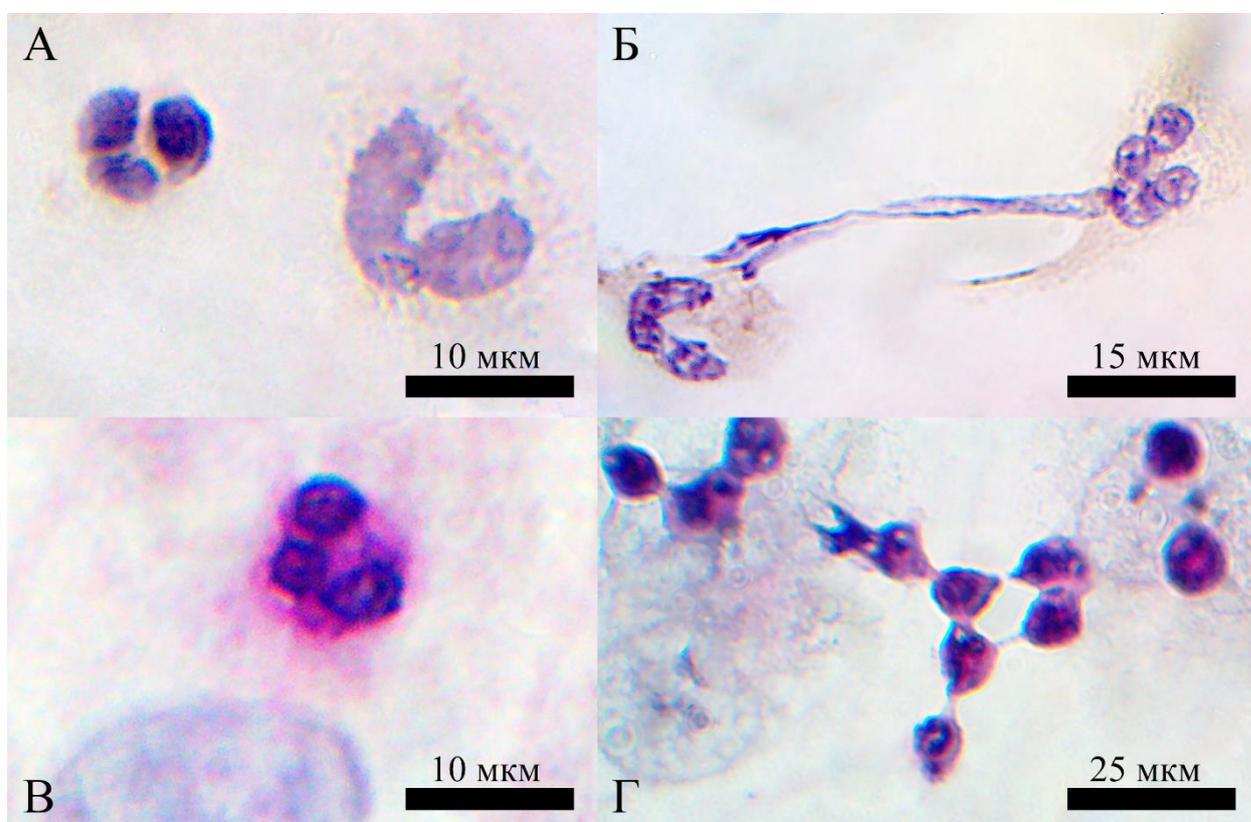


Рисунок 63 – Оценка содержания гликогена в нейтрофилах. (А) – контрольные нейтрофилы на поверхности чашки Петри; (Б) – стимуляция нейтрофилов *S.aureus* 2879М на чашке Петри; (В) – контрольные нейтрофилы на эндотелиальном монослое; (Г) – стимуляция нейтрофилов *S.aureus* 2879М на эндотелиальном монослое. В нейтрофилах на эндотелиальном монослое визуально определяется большее содержание гликогена. Внеклеточные ловушки нейтрофилов (NETs) наблюдаются при стимуляции стафилококками как на чашке Петри, так и на эндотелии.

Среди всех экспериментов с бактериальными штаммами обнаруживались NETs, однако наибольшее количество присутствовало именно в экспериментах с *S.aureus*, в том числе наиболее крупных (рис. 64), что соотносится с полученными ранее результатами [Плескова и др., 2018].

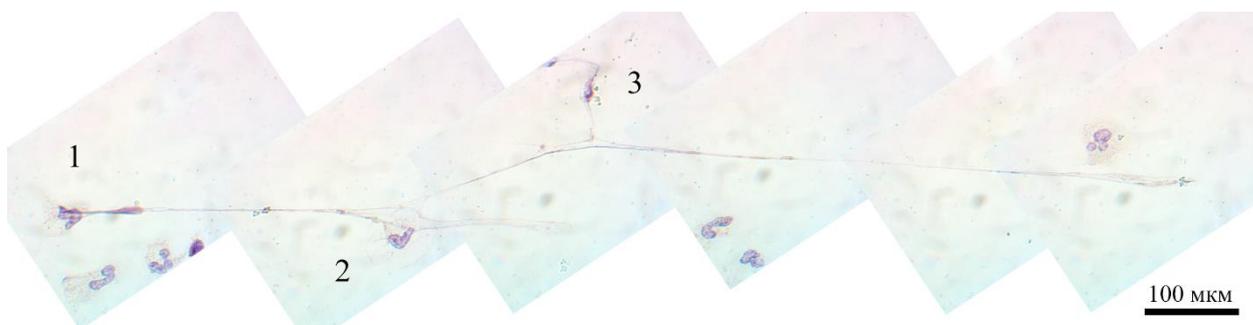


Рисунок 64 – Крупная NET, образованная тремя нейтрофилами при стимуляции *S.aureus* 2879M.

В то же время в экспериментах с LTB<sub>4</sub>, LXA<sub>4</sub>, ФНО $\alpha$  нетоз практически не наблюдался, хотя установлено, что эти хемоаттрактанты усиливают формирование NETs при воспалении [Pan et al., 2022; 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 нетоз.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В процессе миграции нейтрофилы обнаруживают гетерогенность поведения и различия в морфологических перестройках, механических свойствах и миграционном потенциале в зависимости от функционального состояния и условий реализации процесса. В частности, ригидность мембрано-цитоскелетного комплекса существенно изменяется в зависимости от того, какой путь миграции реализуется: движение вдоль эндотелия или через него. Были выявлены и некоторые специфические особенности поведения клеток в зависимости от используемого хемоаттрактанта.

Однако, несмотря на такие особенности был выявлен и целый ряд общих закономерностей. Было показано, что основной стратегией трансэндотелиальной миграции нейтрофилов, в независимости от типа используемого бактериального хемоаттрактанта является первоначальная единичная миграция нейтрофила в определенных участках эндотелиального монослоя, которые мы обозначили как «зоны входа» с последующей массовой миграцией и роением нейтрофилов в этих же участках. При трансэндотелиальной миграции модуль Юнга мигрирующих клеток снижался. Было выявлено, что миграция отдельных нейтрофилов по градиенту хемоаттракции в модели бактериемии может быть сорвана из-за необратимых адгезионных взаимодействий с фибриллярными отростками эндотелия. Такой процесс либо приводил к тому, что у клеток наступало состояние анергии, либо, в некоторых случаях, провоцировал гибель нейтрофилов с образованием NETs. Срыв миграции единичных нейтрофилов подчеркивает необходимость взаимосвязи и коммуникации между нейтрофилами и важности «чувства кворума» в миграционном процессе. Активированный нейтрофил способен к направленному перемещению по градиентам бактериальных хемоаттрактантов вдоль эндотелия, этот процесс существенно усиливается в присутствии биохимических градиентов хемоаттракции, созданных ФНО $\alpha$ , LTB $_4$ , LXA $_4$ , которые самостоятельно не

вызывали направленной поляризации клетки. В условиях гемодинамического сдвига при наличии бактериального градиента хемоаттракции нейтрофилы способны противостоять потоку за счет образования «привязей». Впервые был продемонстрирован процесс активации эндотелия при множественных адгезионных контактах с праймированными нейтрофилами, здесь также оказался важным количественный эффект, поскольку продукция АФК/ АФА эндотелиоцитами возрастает при контакте с множеством праймированных нейтрофилов, тогда как активации эндотелиальных клеток при взаимодействии с интактным нейтрофилом не происходит. По всей видимости это имеет важный физиологический смысл, поскольку эндотелий не должен активироваться при случайном контакте с нейтрофилами, вышедшими в маргинальный пул. Кроме того, для нейтрофила также важно функциональное состояние при контакте с эндотелием: если интактная клетка в момент контакта с эндотелием не демонстрирует увеличения базового уровня продукции АФК, то в праймированном нейтрофиле АФК-продукция существенно увеличивается в момент контакта с эндотелиальным барьером. На рисунке 65 схематично отражена обнаруженная в процессе исследования феноменология миграции нейтрофилов.

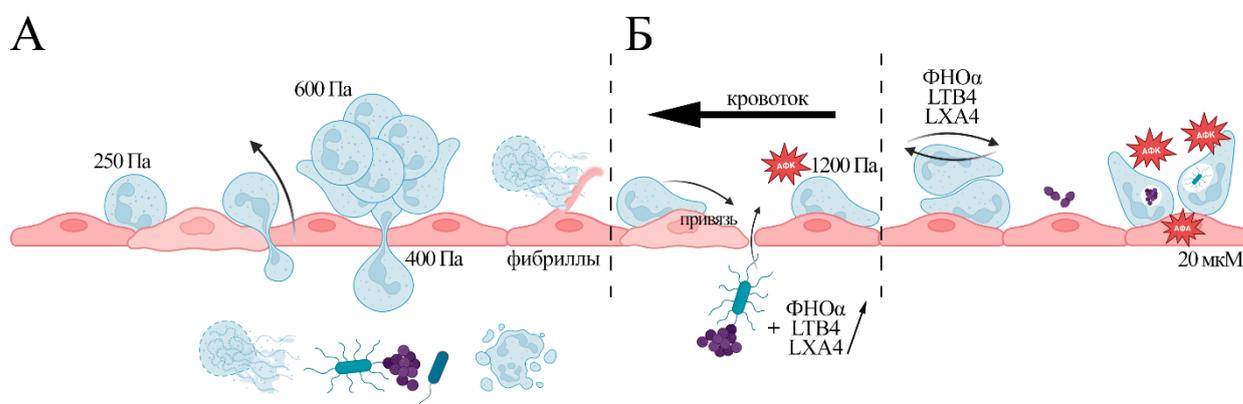


Рисунок 65 – Особенности морфо-механических и функциональных перестроек нейтрофилов в разных условиях трансэндотелиальной миграции (А) и миграции вдоль эндотелия (Б).

На основании полученных результатов были сделаны следующие **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. Роевание 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 $\alpha$ , 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 ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Ванеев, А. Н. Определение активных форм кислорода в биологических жидкостях с помощью платинового наноэлектрода амперометрическим методом / А. Н. Ванеев, А. В. Алова, А. С. Ерофеев [и др.] // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2018. – №. 6 – С. 157-163.
2. Воротников, А. В. Хемотаксис: движение, направление, управление / А. В. Воротников // Успехи биологической химии. – 2011. – № 51. – С. 335-400.
3. Кашутин, С. Л. Изучение содержания нейтрофилов, несущих молекулы адгезии, у больных псориазом в зависимости от соматотипа / С. Л. Кашутин, А. К. Шерстенникова, О. В. Калмин [и др.] // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2018.
4. Куликова, О. А. Иммунологические особенности аллергического ринита в сочетании с хроническим риносинуситом бактериальной этиологии / О. А. Куликова, Е. А. Орлова, Н. И. Баранова // Медицинская иммунология. – 2022. – Т. 24. – № 1. – С. 97-108.
5. Маянский, А. Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге [Текст] / А. Н. Маянский, Д. Н. Маянский ; отв. ред. В. П. Казначеев ; АН СССР, Сибирское отделение, АМН СССР, Сибирское отделение, Ин-т клинич. и эксперим. медицины. – 2-е изд., перераб. и доп. – Новосибирск : Наука, Сибирское отделение, 1989. – 340 с.
6. Мягдиева, И. Р. Роль циркулирующих нейтрофилов в прогрессировании рака почки / И. Р. Мягдиева, Т. В. Абакумова, Д. Р. Долгова [и др.] // Успехи молекулярной онкологии. – 2024. – Т. 11. – № 1. – С. 99-104.
7. Плескова, С. Н. Альтерация нейтрофильных гранулоцитов и лимфоцитов под влиянием квантовых точек (исследование с использованием атомно-силовой микроскопии) / С. Н. Плескова, С. З. Бобык, О. И. Фомичев [и др.] // Морфология. – 2019. – Т. 156. – № 4. – С. 56-61.
8. Плескова, С.Н. Морфо-физиологические аспекты гуморальных и клеточных механизмов неспецифической резистентности организма :

диссертация ... доктора биологических наук : 03.00.13, 14.00.36 / Плескова Светлана Николаевна; Нижегород. гос. ун-т им. Н.И. Лобачевского. – Нижний Новгород, 2009. – 290 с.

9. Плескова, С. Н. Морфологические особенности быстрого и классического нетоза / С. Н. Плескова, Е. Н. Горшкова, А. В. Боряков [и др.] // Цитология. – 2019. – Т. 61. – № 9. – С. 704-712.

10. Плескова, С. Н. Провоспалительные механизмы гибели нейтрофильных гранулоцитов / С. Н. Плескова, Р. Н. Крюков // Цитология. – 2019. – Т. 61. – № 5. – С. 357-369.

11. Подосинников, И. В. Метод определения хемотаксической активности лейкоцитов / И. В. Подосинников, Л. Г. Нилова, И. В. Бабичев // Лабораторное дело. – 1981. – № 8. – С. 68-70.

12. Рашина, О. В. Роль молекул клеточной адгезии в воспалительном процессе и развитии язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, их молекулярно-генетические детерминанты / О. В. Рашина, М. И. Чурносов // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2022. – № 9. – С. 201-208.

13. Таганович, А. Роль хемокинов в патогенезе и течении немелкоклеточного рака легкого / А. Таганович, Н. Ковганко, Н. Таганович // Наука и инновации. – 2019. – № 4(194). – С. 11-17.

14. Ярилин, А. А. Иммунология : учебник / А. А. Ярилин. – М. : ГЭОТАР Медиа, 2010. – 752 с.

15. Adrover, J. M. Programmed «disarming» of the neutrophil proteome reduces the magnitude of inflammation / J. M. Adrover, M. A. Ballesteros, I. M. Samper-Navarro [et al.] // Nat Immunol. – 2020. – Т. 21. – С. 135-144.

16. Alemán, O. R. Human neutrophil Fc $\gamma$  receptors: different buttons for different responses / O. R. Alemán, C. Rosales // J Leukoc Biol. – 2023. – Т. 114. – С. 571-584.

17. Alimohamadi, H. The role of traction in membrane curvature generation / H. Alimohamadi, R. Vasan, J. Hassinger [et al.] // *Mol. Biol. Cell.* – 2018. – T. 29. – C. 2024-2035.
18. Allport, J. R. Neutrophils from MMP-9- or neutrophil elastase-deficient mice show no defect in transendothelial migration under flow in vitro / J. R. Allport, Y. C. Lim, J. M. Shipley [et al.] // *J Leukoc Biol.* – 2002. – T. 71. – № 5. – C. 821-828.
19. Alonso, A. Persistent pseudopods splitting is an effective chemotaxis strategy in shallow gradients / A. Alonso, J. B. Kirkegaard, R. G. Endres // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2025. – T. 122. – № 19. – C. e2502368122.
20. Alves-Filho, J. C. Regulation of chemokine receptor by Toll-like receptor 2 is critical to neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis / J. C. Alves-Filho, A. Freitas, F. O. Souto [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2009. – T. 106. – № 10. – C. 4018-4023.
21. Ambler, W. G. Vascular damage in systemic lupus erythematosus / W. G. Ambler, M. J. Kaplan // *Nat Rev Nephrol.* – 2024. – T. 20. – № 4. – C. 251–265.
22. Aretz, J. Talin and kindlin use integrin tail allostery and direct binding to activate integrins / J. Aretz, M. Aziz, N. Strohmeyer [et al.] // *Nat Struct Mol Biol.* – 2023. – T. 30. – C. 1913-1924.
23. Asahara, M. Role of leukotriene B4 (LTB4)-LTB4 receptor 1 signaling in post-incisional nociceptive sensitization and local inflammation in mice / M. Asahara, N. Ito, Y. Hoshino [et al.] // *PLoS One.* – 2022. – T. 17. – № 10. – C. e0276135.
24. Azhar, N. A putative “chemokine switch” that regulates systemic acute inflammation in humans / N. Azhar, R. A. Namas, K. Almahmoud [et al.] // *Sci ReC.* – 2021. – T. 11. – C. 9703.
25. Bagaitkar, J. NADPH oxidase activation regulates apoptotic neutrophil clearance by murine macrophages / J. Bagaitkar, J. Huang, M. Y. Zeng [et al.] // *Blood.* – 2018. – T. 131. – № 21. – C. 2367-2378.
26. Bagur, R. Intracellular Ca<sup>2+</sup> sensing: its role in calcium homeostasis and signaling / R. Bagur, G. Hajnóczky // *Mol Cell.* – 2017. – T. 66. – C. 780–788.

27. Banoth, B. Mitochondria in innate immune signaling / B. Banoth, S. L. Cassel // *Transl Res.* – 2018. – T. 202. – C. 52-68.
28. Baz, A. A. Neutrophil extracellular traps in bacterial infections and evasion strategies / A. A. Baz, M. Y. Zeng, L. J. Perez-Zapata [et al.] // *Front Immunol.* – 2024. – T. 15. – C. 1357967.
29. Becker, S. Membrane potential dynamics of C5a-stimulated neutrophil granulocytes / S. Becker, A. Swoboda, H. Siemer [et al.] // *Pflugers Arch.* – 2024. – T. 476. – № 6. – C. 1007-1018.
30. Bouti, C.  $\beta 2$  integrin signaling cascade in neutrophils: more than a single function / C. Bouti, A. Margraf, K. Thomas [et al.] // *Front. Immunol.* – 2020. – T. 11. – C. 619925.
31. Bradley, L. M. Matrix metalloprotease 9 mediates neutrophil migration into the airways in response to influenza virus-induced toll-like receptor signaling / L. M. Bradley, M. F. Douglass, D. Chatterjee [et al.] // *PLoS Pathog.* – 2012. – T. 8. – № 4. – C. e1002641.
32. Brinkmann, V. Neutrophil extracellular traps kill bacteria / V. Brinkmann, U. Reichard, C. Goosmann [et al.] // *Science.* – 2004. – T. 303. – № 5663. – C. 1532-1535.
33. Brostjan, C. The role of neutrophil death in chronic inflammation and cancer / C. Brostjan, R. Oehler // *Cell Death Discov.* – 2020. – T. 6. – C. 26.
34. Brown, L. Neutrophil swarming: is a good offense the best defense? / L. Brown, B. G. Yipp // *iScience.* – 2023. – T. 26. – № 9. – C. 107655.
35. Broz, C. Innate immune response to *Salmonella typhimurium*, a model enteric pathogen / C. Broz, M. B. Ohlson, D. M. Monack // *Gut Microbes.* – 2012. – T. 3. – № 2. – C. 62-70.
36. Bruserud, Ø. The regulation of neutrophil migration in patients with sepsis: the complexity of the molecular mechanisms and their modulation in sepsis and the heterogeneity of sepsis patients / Ø. Bruserud, K. A. Mosevoll, Ø. Bruserud [et al.] // *Cells.* – 2023. – T. 12. – C. 1003.

37. Buffone, A. Human neutrophils will crawl upstream on ICAM-1 if Mac-1 is blocked / A. Buffone, N. R. Anderson, D. A. Hammer // *Biophys J.* – 2019. – T. 117. – № 8. – C. 1393-1404.
38. Bui, T. M. ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis / T. M. Bui, H. L. Wiesolek, R. Sumagin // *J Leukoc Biol.* – 2020. – T. 108. – № 3. – C. 787-799.
39. Cappenberg, A. L-selectin shedding affects bacterial clearance in the lung: a new regulatory pathway for integrin outside-in signaling / A. Cappenberg, A. Margraf, K. Thomas [et al.] // *Blood.* – 2019. – T. 134. – C. 1445-1457.
40. Cappenberg, A. Selectin-mediated signaling-shedding light on the regulation of integrin activity in neutrophils / A. Cappenberg, M. Kardell, A. Zarbock // *Cells.* – 2022. – T. 11. – № 8. – C. 1310.
41. Capucetti, A. Multiple roles for chemokines in neutrophil biology / A. Capucetti, F. Albano, R. Bonecchi // *Front Immunol.* – 2020. – T. 11. – C. 1259.
42. Carman, C. V. A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them / C. V. Carman, T. A. Springer // *J Cell Biol.* – 2004. – T. 167. – C. 377-388.
43. Carman, C. V. Mechanisms for transcellular diapedesis: probing and pathfinding by invadosome-like protrusions / C. V. Carman // *J Cell Sci.* – 2009. – T. 122. – № 17. – C. 3025-3035.
44. Carman, C. V. Transcellular diapedesis is initiated by invasive podosomes / C. V. Carman, C. T. Sage, T. E. Sciuto [et al.] // *Immunity.* – 2007. – T. 26. – № 6. – C. 784-797.
45. Carman, C. V. Trans-cellular migration: Cell–cell contacts get intimate / C. V. Carman, T. A. Springer // *Curr Opin Cell Biol.* – 2008. – T. 20. – C. 533-540.
46. Carnevale, S. Neutrophil diversity in inflammation and cancer / S. Carnevale, F. V. Castanheira, R. G. Ferreira [et al.] // *Front. Immunol.* – 2023. – T. 14. – C. 1180810.

47. Cha, M. J. Neutrophil recruitment in arterial thrombus and characteristics of stroke patients with neutrophil-rich thrombus / M. J. Cha, J. Ha, H. Lee [et al.] // *Yonsei Med J.* – 2022. – T. 63. – № 11. – C. 1016-1026.
48. Chase, S. D. E-selectin ligands as mechanosensitive receptors on neutrophils in health and disease / S. D. Chase, J. L. Magnani, S. I. Simon // *Ann Biomed Eng.* – 2012. – T. 40. – № 4. – C. 849-859.
49. Chen, J. Akt isoforms differentially regulate neutrophil functions / J. Chen, H. Tang, N. Hay [et al.] // *Blood.* – 2010. – T. 115. – C. 4237-4246.
50. Chen, T. New insights into constitutive neutrophil death / T. Chen, Q. Ren, F. Ma // *Cell Death Discov.* – 2025. – T. 11. – C. 6.
51. Chen, Z. The emerging role of neutrophil extracellular traps in sepsis and sepsis-associated thrombosis / Z. Chen, Y. Li, X. Wang [et al.] // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2021. – T. 11. – C. 653228.
52. Cheng, Y. Potential roles and targeted therapy of the CXCLs/CXCR2 axis in cancer and inflammatory diseases / Y. Cheng, X.-L. Ma, Y.-Q. Wei [et al.] // *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* – 2019. – T. 1871. – C. 289-312.
53. Chenouard, N. Multiple hypothesis tracking for cluttered biological image sequences / N. Chenouard, I. Bloch, J. C. Olivo-Marin // *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell.* – 2013. – T. 35. – № 11. – C. 2736-2750.
54. Cheung, G. Y. C. Phenol-soluble modulins—critical determinants of staphylococcal virulence / G. Y. C. Cheung, H.-S. Joo, S. S. Chatterjee [et al.] // *FEMS Microbiol Rev.* – 2014. – T. 38. – C. 698-719.
55. Clarke, R. W. Low-stress ion conductance microscopy of sub-cellular stiffness / R. W. Clarke, C. Novak, A. Zhukov [et al.] // *Soft Matter.* – 2016. – T. 12. – № 38. – C. 7953-7958.
56. Colom, B. Leukotriene B4-neutrophil elastase axis drives neutrophil reverse transendothelial cell migration in vivo / B. Colom, M. L. Sánchez-Muñoz, A. M. García-Ceca [et al.] // *Immunity.* – 2015. – T. 42. – C. 1075-1086.

57. Couper, R. Neutrophil dysfunction in glycogen storage disease Ib: association with Crohn's-like colitis / R. Couper, J. Kapelushnik, A. M. Griffiths // *Gastroenterology*. – 1991. – T. 100. – № 2. – С. 549-554.
58. Cugno, A. Biomechanics of Neutrophil Tethers / A. Cugno, M. Marki, K. Ley // *Life (Basel)*. – 2021. – T. 11. – № 6. – С. 515.
59. Dahlgren, C. Signaling by neutrophil G protein-coupled receptors that regulate the release of superoxide anions / C. Dahlgren, H. Forsman, M. Sundqvist [et al.] // *J Leukoc Biol*. – 2024. – T. 116. – № 6. – С. 1334-1351.
60. Daly, C. A. Regulatory mechanisms of cytoneme-based morphogen transport / C. A. Daly, E. T. Hall, S. K. Ogden // *Cell Mol Life Sci*. – 2022. – T. 79. – С. 119.
61. Das, D. Complement component 5a receptor 1 and leukotriene B4 receptor 1 regulate neutrophil extracellular trap (NET) formation through Rap1a/B-Raf/ERK signaling pathway and their deficiency in term low birth weight newborns leads to deficient NETosis / D. Das, H. Thacker, K. Priya [et al.] // *Int Immunopharmacol*. – 2024. – T. 142, ЧАСТЬ В. – С. 113165.
62. de Oliveira, S. Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse / S. de Oliveira, E. E. Rosowski, A. Huttenlocher // *Nat Rev Immunol*. – 2016. – T. 16. – С. 378-391.
63. de Oliveira, T. H. C. Intravital microscopic evaluation of the effects of a CXCR2 antagonist in a model of liver ischemia reperfusion injury in mice / T. H. C. de Oliveira, P. E. Marques, F. Poosti [et al.] // *Front Immunol*. – 2018. – T. 8. – С. 1917.
64. Delobel, C. CXCR2 intrinsically drives the maturation and function of neutrophils in mice / C. Delobel, B. Ginter, E. Rubio [et al.] // *Front Immunol*. – 2022. – T. 13. – С. 1005551.
65. Devreotes, C. Signaling networks that regulate cell migration / C. Devreotes, A. R. Horwitz // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. – 2015. – T. 7. – С. a005959.

66. DiMilla, C. A. Mathematical model for the effects of adhesion and mechanics on cell migration speed / C. A. DiMilla, J. A. Stone, J. A. Quinn // *J Cell Biol.* – 1993. – T. 122. – C. 729–737.
67. Domínguez-Luis, M. J. L-selectin expression is regulated by CXCL8-induced reactive oxygen species produced during human neutrophil rolling / M. J. Domínguez-Luis, E. Armas-González, A. Herrera-García [et al.] // *Eur J Immunol.* – 2019. – T. 49. – C. 386-397.
68. Eash, K. J. CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow / K. J. Eash, A. M. Greenbaum, C. K. Gopalan [et al.] // *J Clin Invest.* – 2010. – T. 120. – C. 2423-2431.
69. Elks, C. M. Activation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (Hif-1 $\alpha$ ) delays inflammation resolution by reducing neutrophil apoptosis and reverse migration in a zebrafish inflammation model / C. M. Elks, A. M. van der Meer, S. A. Renshaw [et al.] // *Blood.* – 2011. – T. 118. – C. 712-722.
70. Eustache, J. H. Casting a wide net on surgery: the central role of neutrophil extracellular traps / J. H. Eustache, M. J. McIlwain, K. A. Elfer [et al.] // *Ann Surg.* – 2020. – T. 272. – C. 277-283.
71. Fan, Z. Neutrophil recruitment limited by high-affinity bent  $\beta$ 2 integrin binding ligand in cis / Z. Fan, S. McArdle, A. Marki [et al.] // *Nat Commun.* – 2016. – T. 7. – C. 12658.
72. Fattori, V. Neutrophils and arthritis: Role in disease and pharmacological perspectives / V. Fattori, F. A. Amaral, W. A. Verri // *Pharmacol Res.* – 2016. – T. 112. – C. 84-98.
73. Fetz, A. E. Human neutrophil Fc $\gamma$ RIIIb regulates neutrophil extracellular trap release in response to electrospun polydioxanone biomaterials / A. E. Fetz, M. Z. Radic, G. L. Bowlin // *Acta Biomater.* – 2021. – T. 130. – C. 281-290.
74. Fichman, Y. ROS are evolutionary conserved cell-to-cell stress signals / Y. Fichman, L. Rowland, M. J. Oliver [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2023. – T. 120. – № 31. – C. e2305496120.

75. Filippi, M. D. Neutrophil transendothelial migration: updates and new perspectives / M. D. Filippi // *Blood*. – 2019. – T. 133. – № 20. – C. 2149-2158.
76. Futosi, K. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways / K. Futosi, S. Fodor, A. Mócsai // *Int Immunopharmacol*. – 2013. – T. 17. – № 3. – C. 638-650.
77. Gan, T. T. TLR3 regulated poly I:C-induced neutrophil extracellular traps and acute lung injury partly through p38 MAP kinase / T. T. Gan, Y. L. Yang, F. Hu [et al.] // *Front Microbiol*. – 2018. – T. 9. – C. 3174.
78. Germic, N. Regulation of the innate immune system by autophagy: neutrophils, eosinophils, mast cells, NK cells / N. Germic, Z. Frangez, S. Yousefi [et al.] // *Cell Death Differ*. – 2019. – T. 26. – C. 715-727.
79. Gil, E. Pericyte-derived chemokines amplify neutrophil recruitment across the cerebrovascular endothelial barrier / E. Gil, C. Venturini, D. Stirling [et al.] // *Front Immunol*. – 2022. – T. 13. – C. 935798.
80. Girbl, T. Distinct compartmentalization of the chemokines CXCL1 and CXCL2 and the atypical receptor ACKR1 determine discrete stages of neutrophil diapedesis / T. Girbl, T. Lenn, L. Perez [et al.] // *Immunity*. – 2018. – T. 49. – № 6. – C. 1062-1076.
81. Golenkina, E. A. ATP and formyl peptides facilitate chemoattractant leukotriene-B4 synthesis and drive calcium fluxes, which may contribute to neutrophil swarming at sites of cell damage and pathogens invasion / E. A. Golenkina, G. M. Viryasova, S. I. Galkina [et al.] // *Biomedicines*. – 2024. – T. 12. – № 6. – C. 1184.
82. Gupta, A. K. Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death / A. K. Gupta, M. B. Joshi, M. Philippova [et al.] // *FEBS Lett*. – 2010. – T. 584. – C. 3193-3197.
83. Gupta, E. Unravelling the differential host immuno-inflammatory responses to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* infections in sepsis / E. Gupta, S. Kumar, V. K. Srivastava [et al.] // *Vaccines*. – 2022. – T. 10. – C. 1648.

84. Ha, H. Role of the CXCL8-CXCR1/2 axis in cancer and inflammatory diseases / H. Ha, B. Debnath, N. Neamati // *Theranostics*. – 2017. – T. 7. – C. 1543-1588.
85. Hadjithodorou, A. Directional reorientation of migrating neutrophils is limited by suppression of receptor input signaling at the cell rear through myosin II activity / A. Hadjithodorou, G. R. R. Bell, F. Ellett [et al.] // *Nat Commun*. – 2021. – T. 12. – C. 6619.
86. Hadley, J. S. Peptidoglycan of *Staphylococcus aureus* upregulates monocyte expression of CD14, toll-like receptor 2 (TLR2), and TLR4 in human blood: possible implications for priming of lipopolysaccharide signaling / J. S. Hadley, J. E. Wang, S. J. Foster [et al.] // *Infect Immun*. – 2005. – T. 73. – № 11. – C. 7613-7619.
87. Hamza, B. Retrotaxis of human neutrophils during mechanical confinement inside microfluidic channels / B. Hamza, S. T. Limozin, S. Mendez [et al.] // *Integr Biol (Camb)*. – 2014. – T. 6. – C. 175-183.
88. Harding, M. G. Neutrophil crawling in capillaries; a novel immune response to *Staphylococcus aureus* / M. G. Harding, K. Zhang, J. Conly [et al.] // *PLoS Pathog*. – 2014. – T. 10. – № 10. – C. e1004379.
89. Haynes, M. E. Neutrophil infiltration and function in the pathogenesis of inflammatory airspace disease / M. E. Haynes, S. D. McDonald, L. A. Marshall [et al.] // *The American Journal of Pathology*. – 2024. – T. 194. – № 5. – C. 628-636.
90. He, R. The role of the LTB4-BLT1 axis in health and disease / R. He, Y. Chen, Q. Cai // *Pharmacol Res*. – 2020. – T. 158. – C. 104857.
91. Heidecke, C.-D. Selective defects of T lymphocyte function in patients with lethal intraabdominal infection / C.-D. Heidecke, T. Hensler, H. Weighardt [et al.] // *Am J Surg*. – 1999. – T. 178. – C. 288-292.
92. Hossain, M. Endothelial LSP1 modulates extravascular neutrophil chemotaxis by regulating nonhematopoietic vascular PECAM-1 expression / M. Hossain, S. M. Qadri, N. Xu [et al.] // *J Immunol*. – 2015. – T. 195. – № 5. – C. 2408-2416.

93. Huber, A. R. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8 / A. R. Huber, S. L. Kunkel, R. F. Todd // *Science*. – 1991. – T. 254. – № 5028. – C. 99-102.
94. Isles, H. M. Pioneer neutrophils release chromatin within in vivo swarms / H. M. Isles, C. A. Loynes, S. Alasmari [et al.] // *eLife*. – 2021. – T. 10. – C. e68755.
95. Ivetic, A. A head-to-tail view of L-selectin and its impact on neutrophil behaviour / A. Ivetic // *Cell Tissue Res*. – 2018. – T. 371. – № 3. – C. 437-453.
96. Ivetic, A. L-selectin: a major regulator of leukocyte adhesion, Migration and signaling / A. Ivetic, H. L. Hoskins Green, S. J. Hart // *Front Immunol*. – 2019. – T. 10. – C. 1068.
97. James, C. NETosis in surgery: pathophysiology, prevention, and treatment / C. James, D. Kaushal, R. Beaumont-Wilson // *Ann Surg*. – 2024. – T. 279. – C. 765-780.
98. Jamieson, T. Inhibition of CXCR2 profoundly suppresses inflammation-driven and spontaneous tumorigenesis / T. Jamieson, M. Clarke, C. W. Steele [et al.] // *J Clin Invest*. – 2012. – T. 122. – C. 3127-3144.
99. Ji, J. Neutrophil in reverse migration: role in sepsis / J. Ji, J. Fan // *Front Immunol*. – 2021. – T. 12. – C. 656039.
100. Jin, H. CIRP induces neutrophil reverse transendothelial migration in sepsis / H. Jin, M. Aziz, Y. Ode [et al.] // *Shock*. – 2019. – T. 51. – C. 548-556.
101. Joffre, J. Endothelial responses in sepsis / J. Joffre, J. Hellman, C. Ince [et al.] // *Am J Respir Crit Care Med*. – 2020. – T. 202. – № 3. – C. 361-370.
102. Joulia, R. Neutrophil breaching of the blood vessel pericyte layer during diapedesis requires mast cell-derived IL-17A / R. Joulia, I. M. Guerrero-Fonseca, T. Girbl [et al.] // *Nat Commun*. – 2022. – T. 13. – C. 7029.
103. Kempers, L. Defective neutrophil transendothelial migration and lateral motility in ARPC1B deficiency under flow conditions / L. Kempers, E. G. G. Sprenkeler, A. C. I. van Steen [et al.] // *Front Immunol*. – 2021. – T. 12. – C. 678030.

104. Khismatullin, D. B. Leukocyte rolling on P-selectin: a three-dimensional numerical study of the effect of cytoplasmic viscosity / D. B. Khismatullin, G. A. Truskey // *Biophys. J.* – 2012. – T. 102. – C. 1757-1766.
105. Kienle, K. Neutrophils self-limit swarming to contain bacterial growth in vivo / K. Kienle, K. M. Glaser, S. Eickhoff [et al.] // *Science.* – 2021. – T. 372. – № 6548. – C. eabe7729.
106. Kikuchi-Ueda, T. Priming effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  on production of reactive oxygen species during *Toxoplasma gondii* stimulation and receptor gene expression in differentiated HL-60 cells / T. Kikuchi-Ueda, T. Ubagai, Y. Ono // *J Infect Chemother.* – 2013. – T. 19. – № 6. – C. 1053–1064.
107. Kobayashi, S. D. Microbes and the fate of neutrophils / S. D. Kobayashi, F. R. DeLeo, M. T. Quinn // *Immunol Rev.* – 2023. – T. 314. – C. 210-228.
108. Kolasangiani, R. Integrin conformational dynamics and mechanotransduction / R. Kolasangiani, T. C. Bidone, M. A. Schwartz // *Cells.* – 2022. – T. 11. – № 22. – C. 3584.
109. Korbecki, J. CXCR2 receptor: regulation of expression, signal transduction, and involvement in cancer / J. Korbecki, C. Kupnicka, M. Chlubek [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2022. – T. 23. – № 4. – C. 2168.
110. Kumar, S. Cdc42 regulates neutrophil migration via crosstalk between WASp, CD11b, and microtubules / S. Kumar, J. Xu, C. Perkins [et al.] // *Blood.* – 2012. – T. 120. – № 17. – C. 3563-3574.
111. Kuwano, Y. Rolling on E- or P-selectin induces the extended but not high-affinity conformation of LFA-1 in neutrophils / Y. Kuwano, O. Spelten, H. Zhang [et al.] // *Blood.* – 2010. – T. 116. – C. 617-624.
112. Lammermann, T. Neutrophil swarms require LTB4 and integrins at sites of cell death in vivo / T. Lammermann, C. V. Afonso, B. R. Angermann [et al.] // *Nature.* – 2013. – T. 498. – C. 371-375.
113. Landskron, G. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment / G. Landskron, M. de la Fuente, C. Thuwajit [et al.] // *J Immunol Res.* – 2014. – C. 149185.

114. Lawrence, S. M. How neutrophils meet their end / S. M. Lawrence, R. Corriden, V. Nizet // *Trends Immunol.* – 2020. – T. 41. – C. 531-544.
115. Lazenec, G. CXCR2 chemokine receptor – a master regulator in cancer and physiology / G. Lazenec, A. Rajarathnam, A. Richmond // *Trends Mol Med.* – 2024. – T. 30. – № 1. – C. 37-55.
116. Lee, E. K. S. Leukotriene B4-mediated neutrophil recruitment causes pulmonary capillaries during lethal fungal sepsis / E. K. S. Lee, M. R. Gillrie, L. Li [et al.] // *Cell Host Microbe.* – 2018. – T. 23. – C. 121-133.
117. Lehman, H. K. The role of neutrophils in host defense and disease / H. K. Lehman, B. H. Segal // *J Allergy Clin Immunol.* – 2020. – T. 145. – № 6. – C. 1535-1544.
118. Lerchenberger, M. Matrix metalloproteinases modulate ameboid-like migration of neutrophils through inflamed interstitial tissue / M. Lerchenberger, B. Uhl, K. Stark [et al.] // *Blood.* – 2013. – T. 122. – C. 770-780.
119. Lerman, Y. V. Neutrophil migration under normal and sepsis conditions / Y. V. Lerman, M. Kim // *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* – 2015. – T. 15. – № 1. – C. 19-28.
120. Lerner, R. Lipoxin A4 induces hyperadhesiveness in human endothelial cells for neutrophils / R. Lerner, M. Heimburger, J. Palmblad // *Blood.* – 1993. – T. 82. – № 3. – C. 948-953.
121. Leshner, M. PAD4 mediated histone hypercitrullination induces heterochromatin decondensation and chromatin unfolding to form neutrophil extracellular trap-like structures / M. Leshner, J. M. Garnett, K. L. Knight [et al.] // *Front Immunol.* – 2012. – T. 3. – C. 307.
122. Li, B. Substance P-regulated leukotriene B4 production promotes acute pancreatitis-associated lung injury through neutrophil reverse migration / B. Li, X. Han, X. Ye [et al.] // *Int Immunopharmacol.* – 2018. – T. 57. – C. 147-156.
123. Li, D. Pattern recognition receptors in health and diseases / D. Li, M. Wu // *Sig Transduct Target Ther.* – 2021. – T. 6. – C. 291.

124. Li, N. Ligand-specific binding forces of LFA-1 and Mac-1 in neutrophil adhesion and crawling / N. Li, H. Yang, M. Wang [et al.] // *Mol Biol Cell*. – 2018. – T. 29. – № 4. – C. 408-418.
125. Liew, C. X. The neutrophil's role during health and disease / C. X. Liew, C. Kubes // *Physiol. Rev.* – 2019. – T. 99. – C. 1223-1248.
126. Lu, J. Roles of neutrophil reactive oxygen species (ROS) generation in organ function impairment in sepsis / J. Lu, J. Liu, A. Li // *J Zhejiang Univ Sci B*. – 2022. – T. 23. – № 6. – C. 437-450.
127. Lundgren, S. M. Signaling dynamics distinguish high- and low-priority neutrophil chemoattractant receptors / S. M. Lundgren, B. L. Rocha-Gregg, E. Akdoğan [et al.] // *Sci Signal*. – 2023. – T. 16. – № 805. – C. eadd1845.
128. Luo, B. H. Structural basis of integrin regulation and signaling / B. H. Luo, C. V. Carman, T. A. Springer // *Annu. Rev. Immunol.* – 2007. – T. 25. – C. 619-647.
129. Lutz, S. E. Caveolin1 is required for Th1 cell infiltration, but not tight junction remodeling, at the blood-brain barrier in autoimmune neuroinflammation / S. E. Lutz, J. R. Smith, D. H. Kim [et al.] // *Cell ReC*. – 2017. – T. 21. – C. 2104-2117.
130. Margraf, A. ArhGAP15, a RacGAP, acts as a temporal signaling regulator of Mac-1 affinity in sterile inflammation / A. Margraf, A. Cappenberg, E. Vadillo [et al.] // *J Immunol.* – 2020. – T. 205. – C. 1365-1375.
131. Marin, V. Endothelial cell culture: protocol to obtain and cultivate human umbilical endothelial cells / V. Marin, G. Kaplanski, S. Grès [et al.] // *J Immunol Methods*. – 2001. – T. 254. – C. 183-190.
132. Marki, A. Microfluidics-based side view flow chamber reveals tether-to-sling transition in rolling neutrophils / A. Marki, E. Gutierrez, Z. Mikulski [et al.] // *Scientific Reports*. – 2016. – T. 6. – C. 28870.
133. Marki, A. Rolling neutrophils form tethers and slings under physiologic conditions in vivo / A. Marki, K. Buscher, Z. Mikulski [et al.] // *J Leukoc Biol*. – 2018. – T. 103. – № 1. – C. 67-70.

134. Martin, C. Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence / C. Martin, M. C. Burdon, C. E. Brinkmann [et al.] // *Immunity*. – 2003. – T. 19. – C. 583-593.
135. McCracken, J. M. Regulation of human neutrophil apoptosis and lifespan in health and disease / J. M. McCracken, L. A. Allen // *J Cell Death*. – 2014. – T. 7. – C. 15-23.
136. McManus, J. F. A. Histological and histochemical uses of periodic acid / J. F. A. McManus // *Stain Technol*. – 1948. – T. 23. – C. 99-108.
137. Metzemaekers, M. Neutrophil chemoattractant receptors in health and disease: double-edged swords / M. Metzemaekers, M. Gouwy, C. Proost // *Cell Mol Immunol*. – 2020. – T. 17. – № 5. – C. 433-450.
138. Michael, M. A neutrophil-centric view of chemotaxis / M. Michael, S. Vermeren // *Essays Biochem*. – 2019. – T. 63. – C. 607-618.
139. Mickael, M. E. Paracellular and transcellular leukocytes diapedesis are divergent but interconnected evolutionary events / M. E. Mickael, N. Kubick, C. Klimovich [et al.] // *Genes (Basel)*. – 2021. – T. 12. – № 2. – C. 254.
140. Montaña-Rendón, F. Monitoring phosphoinositide fluxes and effectors during leukocyte chemotaxis and phagocytosis / F. Montaña-Rendón, S. Grinstein, G. F. W. Walpole // *Front Cell Dev Biol*. – 2021. – T. 9. – C. 626136.
141. Morioka, S. Living on the edge: efferocytosis at the interface of homeostasis and pathology / S. Morioka, C. Maueröder, K. S. Ravichandran // *Immunity*. – 2019. – T. 50. – № 5. – C. 1149-1162.
142. Muller, W. A. Transendothelial migration: unifying principles from the endothelial perspective / W. A. Muller // *Immunol Rev*. – 2016. – T. 273. – № 1. – C. 61-75.
143. Nagarkar, D. R. CXCR2 is required for neutrophilic airway inflammation and hyperresponsiveness in a mouse model of human rhinovirus infection / D. R. Nagarkar, Q. Wang, J. Shim [et al.] // *J Immunol*. – 2009. – T. 183. – C. 6698-6707.

144. Naish, E. The formation and function of the neutrophil phagosome / E. Naish, A. J. Wood, A. C. Stewart [et al.] // *Immunol Rev.* – 2023. – T. 314. – № 1. – C. 158-180.
145. Ng, L. G. Heterogeneity of neutrophils / L. G. Ng, R. Ostuni, A. Hidalgo // *Nat Rev Immunol.* – 2019. – T. 19. – C. 255-265.
146. Ng, M. Adaptations of neutrophils in cancer / M. Ng, D. Cerezo-Wallis, L. G. Ng [et al.] // *Immunity.* – 2025. – T. 58. – № 1. – C. 40-58.
147. Niethamer, T. K. Defining the role of pulmonary endothelial cell heterogeneity in the response to acute lung injury / T. K. Niethamer, C. T. Stabler, J. C. Leach [et al.] // *eLife.* – 2020. – T. 9. – C. e53072.
148. Noseykina, E. M. Molecular mechanisms for regulation of neutrophil apoptosis under normal and pathological conditions / E. M. Noseykina, I. A. Schepetkin, D. N. Atochin // *J Evol Biochem Phys.* – 2021. – T. 57. – C. 429-450.
149. Novak, C. Nanoscale live-cell imaging using hopping probe ion conductance microscopy / C. Novak, C. Li, A. I. Shevchuk [et al.] // *Nat Methods.* – 2009. – T. 6. – № 4. – C. 279–281.
150. Nunez, N. Exploration of the role of the virulence factor ElrA during *Enterococcus faecalis* cell infection / N. Nunez, A. Derré-Bobillot, S. Gaubert [et al.] // *Sci ReC.* – 2018. – T. 8. – C. 20206.
151. Nussenzveig, H. M. Cell membrane biophysics with optical tweezers / H. M. Nussenzveig // *Eur Biophys J.* – 2018. – T. 47. – № 5. – C. 499-514.
152. Ode, Y. CIRP increases ICAM-1<sup>+</sup> phenotype of neutrophils exhibiting elevated iNOS and NETs in sepsis / Y. Ode, M. Aziz, C. Wang // *J Leukoc Biol.* – 2018. – T. 103. – C. 693-707.
153. Ortega-Zapero, M. Neutrophils and NETs in pathophysiology and treatment of inflammatory bowel disease / M. Ortega-Zapero, R. Gomez-Bris, I. Pascual-Laguna [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2025. – T. 26. – № 15. – C. 7098.
154. Osaka, M. Critical role of the C5a-activated neutrophils in high-fat diet-induced vascular inflammation / M. Osaka, E. Gutierrez, K. Koltsova [et al.] // *Sci. ReC.* – 2016. – T. 6. – C. 21391.

155. Paclet, M. H. Regulation of neutrophil NADPH oxidase, NOX2: a crucial effector in neutrophil phenotype and function / M. H. Paclet, S. Laurans, S. Dupré-Crochet // *Front Cell Dev Biol.* – 2022. – T. 10. – C. 945749.
156. Pan, W. H. The effect and mechanism of lipoxin A4 on neutrophil function in LPS-induced lung injury / W. H. Pan, X. Hu, B. Chen [et al.] // *Inflammation.* – 2022. – T. 45. – № 5. – C. 1950-1967.
157. Pantarelli, C. Rac-GTPases and Rac-GEFs in neutrophil adhesion, migration and recruitment / C. Pantarelli, H. C. E. Welch // *Eur J Clin Invest.* – 2018. – T. 48, Suppl. 2. – C. e12939.
158. Patin, E. C. Pattern recognition receptors in fungal immunity / E. C. Patin, A. Thompson, S. J. Orr // *Semin. Cell Dev. Biol.* – 2019. – T. 89. – C. 24-33.
159. Peterson, J. M. Selectins in biology and human disease: opportunity in E-selectin antagonism / J. M. Peterson, T. A. Smith, E. C. Rock [et al.] // *Cureus.* – 2024. – T. 16. – № 6. – C. e61996.
160. Petri, B. Neutrophil chemotaxis / B. Petri, M. J. Sanz // *Cell Tissue Res.* – 2018. – T. 371. – № 3. – C. 425-436.
161. Phillipson, M. Vav1 is essential for mechanotactic crawling and migration of neutrophils out of the inflamed microvasculature / M. Phillipson, B. Heit, S. A. Parsons [et al.] // *J Immunol.* – 2009. – T. 182. – № 11. – C. 6870-6878.
162. Pieterse, E. Neutrophil extracellular traps drive endothelial-to-mesenchymal transition / E. Pieterse, N. Rother, M. Garsen [et al.] // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2017. – T. 37. – № 7. – C. 1371-1379.
163. Pleskova, S. N. Conditioning adhesive contacts between the neutrophils and the endotheliocytes by *Staphylococcus aureus* / S. N. Pleskova, R. N. Kriukov, S. Z. Bobyk [et al.] // *J Mol Recognit.* – 2020. – T. 33. – № 9. – C. e2846.
164. Pleskova, S. N. Differences in bacteria nanomotion profiles and neutrophil nanomotion during phagocytosis / S. N. Pleskova, E. V. Lazarenko, N. A. Bezrukov [et al.] // *Front Microbiol.* – 2023. – T. 14. – C. 1113353.
165. Pleskova, S. N. Dynamics of formation and morphological features of neutrophil extracellular traps formed under the influence of opsonized *Staphylococcus*

*aureus* / S. N. Pleskova, E. N. Gorshkova, R. N. Kriukov // J Mol Recognit. – 2018. – T. 31. – № 7. – C. e2707.

166. 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 [et al.] // Microbial Cell. – 2024. – T. 11. – C. 254-264.

167. Pollard, T. D. Actin, a central player in cell shape and movement / T. D. Pollard, J. A. Cooper // Science. – 2009. – T. 326. – № 5957. – C. 1208-1212.

168. Pontes, B. Cell cytoskeleton and tether extraction / B. Pontes, N. B. Viana, L. T. Salgado [et al.] // Biophys J. – 2011. – T. 101. – № 1. – C. 43-52.

169. Pontes, B. Membrane elastic properties and cell function / B. Pontes, Y. Ayala, A. C. Fonseca [et al.] // PLoS One. – 2013. – T. 8. – № 7. – C. e67708.

170. Pruenster, M. Extracellular MRP8/14 is a regulator of  $\beta 2$  integrin-dependent neutrophil slow rolling and adhesion / M. Pruenster, A. Kurz, K. J. Chung [et al.] // Nat Commun. – 2015. – T. 6. – C. 6915.

171. Qi, Y. Microfluidic device reveals new insights into impairment of neutrophil transmigration in patients with sepsis / Y. Qi, J. Li, X. Zhang [et al.] // Biosens Bioelectron. – 2024. – T. 260. – C. 116460.

172. Rahman, I. L-selectin regulates human neutrophil transendothelial migration / I. Rahman, A. Collado Sánchez, J. Davies [et al.] // J Cell Sci. – 2021. – T. 134. – № 3. – C. jcs250340.

173. Rajarathnam, K. How do chemokines navigate neutrophils to the target site: dissecting the structural mechanisms and signaling pathways / K. Rajarathnam, M. Schnoor, R. M. Richardson [et al.] // Cell. Signal. – 2019. – T. 54. – C. 69-80.

174. Ramos, C. Clearance of apoptotic cells by neutrophils in inflammation and cancer / C. Ramos, R. Oehler // Cell Death Discov. – 2024. – T. 10. – C. 26.

175. Ranjan, K. Cellular dynamics of Fas-associated death domain in the regulation of cancer and inflammation / K. Ranjan, C. Pathak // Int J Mol Sci. – 2024. – T. 25. – C. 3228.

176. Riddle, R. B. Endothelial inflammation and neutrophil transmigration are modulated by extracellular matrix composition in an inflammation-on-a-chip model /

R. B. Riddle, K. Jennbacken, K. M. Hansson [et al.] // *Sci ReC.* – 2022. – T. 12. – C. 6855.

177. Ridger, V. C. L- and P-Selectins Collaborate to Support Leukocyte Rolling in Vivo When High-Affinity P-Selectin-P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 Interaction Is Inhibited / V. C. Ridger, J. M. Gibbins, S. C. Watson [et al.] // *The American Journal of Pathology.* – 2004. – T. 166. – № 3. – C. 945-955.

178. Rocheleau, A. D. Effect of pseudopod extensions on neutrophil hemodynamic transport near a wall / A. D. Rocheleau, W. Wang, M. R. King // *Cell Mol Bioeng.* – 2016. – T. 9. – № 1. – C. 85-95.

179. Rocheleau, A. D. Simulation and Analysis of Tethering Behavior of Neutrophils with Pseudopods / A. D. Rocheleau, R. Sumagin, I. H. Sarelius [et al.] // *PLoS One.* – 2015. – T. 10. – № 6. – C. e0128378.

180. Ronchetti, L. Neutrophil extracellular traps in cancer: not only catching microbes / L. Ronchetti, M. C. Bosetti, G. Genovese [et al.] // *J Exp Clin Cancer Res.* – 2021. – T. 40. – C. 231.

181. Salvermoser, M. Nuclear deformation during neutrophil migration at sites of inflammation / M. Salvermoser, D. Begandt, R. Alon [et al.] // *Front Immunol.* – 2018. – T. 9. – C. 2680.

182. Schaff, U. Y. Calcium flux in neutrophils synchronizes beta2 integrin adhesive and signaling events that guide inflammatory recruitment / U. Y. Schaff, I. Yamayoshi, T. Tse [et al.] // *Ann Biomed Eng.* – 2008. – T. 36. – C. 632-646.

183. Schoen, J. Neutrophils' extracellular trap mechanisms: from physiology to pathology / J. Schoen, R. Demmler, M. C. Stemmler [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2022. – T. 23. – C. 12855.

184. Schwartz, A. B. Neutrophils exhibit distinct migration phenotypes that are regulated by transendothelial migration / A. B. Schwartz, A. Kandasamy, J. C. Del Álamo [et al.] // *bioRxiv.* – 2024. – Режим доступа: <https://www.biorxiv.org> (дата обращения: 26.11.2025).

185. Schymeinsky, J. The mammalian actin-binding protein 1 (mAbp1): a novel molecular player in leukocyte biology / J. Schymeinsky, M. Sperandio, B. Walzog // *Trends Cell Biol.* – 2011. – T. 21. – № 4. – C. 247-255.
186. Seree-Aphinan, C. Distinguishing sepsis from infection by neutrophil dysfunction: a promising role of CXCR2 surface level / C. Seree-Aphinan, C. Vichitkunakorn, R. Navakanitworakul [et al.] // *Front Immunol.* – 2020. – T. 11. – C. 608696.
187. Serhan, C. N. Lipid mediators in the resolution of inflammation / C. N. Serhan, N. Chiang, J. Dalli [et al.] // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2014. – T. 7. – C. a016311.
188. Shi, J. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS / J. Shi, R. E. Zhao, Y. Wang [et al.] // *Nature.* – 2014. – T. 514. – C. 187-192.
189. Silva, J. C. Mac-1 triggers neutrophil DNA extracellular trap formation to *Aspergillus fumigatus* independently of PAD4 histone citrullination / J. C. Silva, N. C. Rodrigues, G. A. Thompson-Souza [et al.] // *J Leukoc Biol.* – 2020. – T. 107. – № 1. – C. 69-83.
190. Silva-Oliveira, G. Laminin triggers neutrophil extracellular traps (NETs) and modulates NET release induced by *Leishmania amazonensis* / G. Silva-Oliveira, L. Linhares-Lacerda, T. R. F. Mattos [et al.] // *Biomedicines.* – 2022. – T. 10. – № 3. – C. 521.
191. Singer, M. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3) / M. Singer, C. S. Deutschman, C. W. Seymour [et al.] // *JAMA.* – 2016. – T. 315. – C. 801-810.
192. Snapp, K. R. Attachment of the PSGL-1 cytoplasmic domain to the actin cytoskeleton is essential for leukocyte rolling on P-selectin / K. R. Snapp, C. E. Heitzig, G. S. Kansas // *Blood.* – 2002. – T. 99. – C. 4494-4502.
193. Sollberger, G. Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps / G. Sollberger, A. Choidas, G. L. Burn [et al.] // *Sci Immunol.* – 2018. – T. 3. – № 26. – C. eaar6689.

194. Sônego, F. Paradoxical roles of the neutrophil in sepsis: protective and deleterious / F. Sônego, F. V. Castanheira, R. G. Ferreira [et al.] // *Front Immunol.* – 2016. – T. 7. – C. 155.
195. Stehr, A. M. Neutrophil extracellular traps drive epithelial-mesenchymal transition of human colon cancer / A. M. Stehr, G. Wang, R. Demmler [et al.] // *J Pathol.* – 2022. – T. 256. – № 4. – C. 455-467.
196. Stockwell, B. R. Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease / B. R. Stockwell, J. C. Friedmann Angeli, V. Bayir [et al.] // *Cell.* – 2017. – T. 171. – C. 273-285.
197. Strzelec, M. Immunomodulation – a general review of the current state-of-the-art and new therapeutic strategies for targeting the immune system / M. Strzelec, J. Detka, C. Mieszczak [et al.] // *Front Immunol.* – 2023. – T. 14. – C. 1127704.
198. Subramanian, B. C. The LTB<sub>4</sub>-BLT1 axis regulates the polarized trafficking of chemoattractant GPCRs during neutrophil chemotaxis / B. C. Subramanian, K. Moissoglu, C. A. Parent // *J Cell Sci.* – 2018. – T. 131. – № 18. – C. jcs217422.
199. Sun, Z. Integrin activation by talin, kindlin and mechanical forces / Z. Sun, M. Costell, R. Fässler // *Nat. Cell Biol.* – 2019. – T. 21. – C. 25-31.
200. Sundd, C. ‘Slings’ enable neutrophil rolling at high shear / C. Sundd, E. Gutierrez, K. Koltsova [et al.] // *Nature.* – 2012. – T. 488. – C. 399-403.
201. Takizawa, S. Neutrophil trogocytosis during their trans-endothelial migration: role of extracellular CIRP / S. Takizawa, Y. Lee, A. Jacob [et al.] // *Mol Med.* – 2022. – T. 28. – C. 91.
202. Tang, G. M. Metformin ameliorates sepsis-induced brain injury by inhibiting apoptosis, oxidative stress and neuroinflammation via the PI3K/Akt signaling pathway / G. M. Tang, H. Y. Yang, J. Chen [et al.] // *Oncotarget.* – 2017. – T. 8. – № 58. – C. 97977-97989.
203. Tharp, W. G. Neutrophil chemorepulsion in defined interleukin-8 gradients in vitro and in vivo / W. G. Tharp, R. Yadav, D. Irimia [et al.] // *J Leukoc Biol.* – 2006. – T. 79. – № 3. – C. 539-554.

204. Thieblemont, N. Regulation of macrophage activation by proteins expressed on apoptotic neutrophils: subversion towards autoimmunity by proteinase 3 / N. Thieblemont, V. Witko-Sarsat, A. Ariel // *Eur J Clin Invest.* – 2018. – T. 48, Suppl. 2. – C. e12990.

205. Thomas, C. J. Pattern recognition receptor function in neutrophils / C. J. Thomas, K. Schroder // *Trends Immunol.* – 2013. – T. 34. – № 7. – C. 317–328.

206. Thome, S. Intracellular  $\beta 2$  integrin (CD11/CD18) interacting partners in neutrophil trafficking / S. Thome, D. Begandt, R. Pick [et al.] // *Eur J Clin Invest.* – 2018. – T. 48, Suppl. 2. – C. e12966.

207. Tsai, T. Y. Efficient front-rear coupling in neutrophil chemotaxis by dynamic myosin II localization / T. Y. Tsai, S. R. Collins, C. K. Chan [et al.] // *Dev Cell.* – 2019. – T. 49. – № 2. – C. 189-205.

208. van Bruggen, S. NLRP3 is essential for neutrophil polarization and chemotaxis in response to leukotriene B4 gradient / S. Van Bruggen, C. A. Jarrot, E. Thomas [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2023. – T. 120. – № 35. – C. e2303814120.

209. van Haastert, C. J. M. Chemotaxis: signalling the way forward / C. J. M. Van Haastert, C. N. Devreotes // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2004. – T. 5. – C. 626-634.

210. van Kessel, K. C. Neutrophil-mediated phagocytosis of *Staphylococcus aureus* / K. C. van Kessel, J. Bestebroer, J. A. van Strijp // *Front Immunol.* – 2014. – T. 5. – C. 466.

211. Vaneev, A. *In vitro* and *in vivo* electrochemical measurement of reactive oxygen species after treatment with anticancer drugs / A. Vaneev, C. Gorelkin, A. S. Garanina [et al.] // *Anal Chem.* – 2020. – T. 92. – C. 8010-8014.

212. Verma, N. K. An introduction to LFA-1/ICAM-1 interactions in T-cell motility / N. K. Verma, D. Kelleher // *Methods Mol Biol.* – 2019. – T. 1930. – C. 1-9.

213. Vignarajah, M. Regulation of ICAM-1 in human neutrophils / M. Vignarajah, A. J. T. Wood, E. Nelmes [et al.] // *J Leukoc Biol.* – 2024. – T. 116. – № 4. – C. 901-908.

214. Wang, J.-F. Up-regulation of programmed cell death 1 ligand 1 on neutrophils may be involved in sepsis-induced immunosuppression: an animal study and a prospective case-control study / J.-F. Wang, Y. Zhang, J. Li [et al.] // *Anesthesiology*. – 2015. – T. 122. – C. 852-863.

215. Wang, M. Neutrophil hitchhiking: riding the drug delivery wave to treat diseases / M. Wang, J. Li, F. Zhang [et al.] // *Drug Dev Res*. – 2024. – T. 85. – C. e22169.

216. Wang, N. Structural basis of leukotriene B4 receptor 1 activation / N. Wang, Y. Zhang, X. Li [et al.] // *Nat Commun*. – 2022. – T. 13. – C. 1156.

217. Wang, Y. Expression, role, and regulation of neutrophil Fc $\gamma$  receptors / Y. Wang, F. Jönsson // *Front Immunol*. – 2019. – T. 10. – C. 1958.

218. Watson, J. L. Synthetic Par polarity induces cytoskeleton asymmetry in unpolarized mammalian cells / J. L. Watson, L. K. Krüger, A. J. Ben-Sasson [et al.] // *Cell*. – 2023. – T. 186. – № 21. – C. 4710-4727.

219. Wicki, S. Loss of XIAP facilitates switch to TNF $\alpha$ -induced necroptosis in mouse neutrophils / S. Wicki, T. Gross, M. J. Thome [et al.] // *Cell Death Dis*. – 2016. – T. 7. – C. e2422.

220. Wille, C. PKD regulates actin polymerization, neutrophil deformability, and transendothelial migration in response to fMLP and trauma / C. Wille, T. Eiseler, S. T. Langenberger [et al.] // *J Leukoc Biol*. – 2018. – T. 104. – № 3. – C. 615-630.

221. Wimmer, I. PECAM-1 stabilizes blood-brain barrier integrity and favors paracellular T-cell diapedesis across the blood-brain barrier during neuroinflammation / I. Wimmer, S. Tietz, H. Nishihara [et al.] // *Front Immunol*. – 2019. – T. 10. – C. 711.

222. Woodfin, A. ICAM-1-expressing neutrophils exhibit enhanced effector functions in murine models of endotoxemia / A. Woodfin, M. Beyrau, M.-B. Voisin [et al.] // *Blood*. – 2016. – T. 127. – C. 898-907.

223. Woodfin, A. The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo / A. Woodfin, D. R. Voisin, M. A. Nourshargh [et al.] // *Nat Immunol*. – 2011. – T. 12. – C. 761-769.

224. Xia, M. Conditions that promote transcellular neutrophil migration in vivo / M. Xia, R. I. Stegmeyer, K. Shirakura [et al.] // *Sci ReC.* – 2024. – T. 14. – C. 14471.
225. Xu, Q. Neutrophil reverse migration / Q. Xu, W. Zhao, M. Yan [et al.] // *J Inflamm.* – 2022. – T. 19. – C. 22.
226. Xu, R. Low expression of CXCR1/2 on neutrophils predicts poor survival in patients with hepatitis B virus-related acute-on-chronic liver failure / R. Xu, C. Bao, H. Huang [et al.] // *Sci ReC.* – 2016. – T. 6. – C. 38714.
227. Yang, C. Different faces for different places: heterogeneity of neutrophil phenotype and function / C. Yang, Y. Li, Y. Xie [et al.] // *J Immunol Res.* – 2019. – C. 8016254.
228. Yokomizo, T. Leukotriene receptors as potential therapeutic targets / T. Yokomizo, M. Nakamura, T. Shimizu // *J Clin Invest.* – 2018. – T. 128. – C. 2691-2701.
229. Yokomizo, T. The leukotriene B4 receptors BLT1 and BLT2 as potential therapeutic targets / T. Yokomizo, T. Shimizu // *Immunol Rev.* – 2023. – T. 317. – C. 30-41.
230. Yolland, L. Persistent and polarized global actin flow is essential for directionality during cell migration / L. Yolland, M. Burki, S. Marcotti [et al.] // *Nat Cell Biol.* – 2019. – T. 21. – C. 1370-1381.
231. Yu, C. Pyroptosis: mechanisms and diseases / C. Yu, X. Zhang, N. Liu [et al.] // *Sig Transduct Target Ther.* – 2021. – T. 6. – C. 128.
232. Zarbato, G. F. Dimethyl fumarate limits neuroinflammation and oxidative stress and improves cognitive impairment after polymicrobial sepsis / G. F. Zarbato, M. C. de Souza Goldim, A. D. Giustina [et al.] // *Neurotox Res.* – 2018. – T. 34. – № 3. – C. 418-430.
233. Zhang, D. Neutrophil aging is regulated by the microbiome / D. Zhang, G. Chen, D. Manwani [et al.] // *Nature.* – 2015. – T. 525. – C. 528-532.
234. Zhang, F. Neutrophil diversity and function in health and disease / F. Zhang, Y. Xia, J. Su [et al.] // *Sig Transduct Target Ther.* – 2024. – № 9. – C. 343.

235. Zhang, H. Neutrophil, neutrophil extracellular traps and endothelial cell dysfunction in sepsis / H. Zhang, Z. Li, Y. Chen [et al.] // *Clin Transl Med.* – 2023. – T. 13. – C. e1170.
236. Zhang, Q. Specialized pro-resolving lipid mediators: a key player in resolving inflammation in autoimmune diseases / Q. Zhang, Y. Wang, J. Zhu [et al.] // *Sci Bull (Beijing).* – 2025. – T. 70. – № 5. – C. 778-794.
237. Zhang, X. The role of CXCR2 in acute inflammatory responses and its antagonists as anti-inflammatory therapeutics / X. Zhang, R. Guo, H. Kambara [et al.] // *Curr Opin Hematol.* – 2019. – T. 26. – № 1. – C. 28-33.
238. Zhang, Y. Gene profiling of Toll-like receptor signalling pathways in neutrophils of patients with acute-on-chronic liver failure / Y. Zhang, W. Wu, Y. Wang [et al.] // *J Transl Med.* – 2021. – T. 19. – C. 465.
239. Zhao, T. The molecular basis for adhesion-mediated suppression of reactive oxygen species generation by human neutrophils / T. Zhao, V. Benard, B. C. Bohl [et al.] // *J Clin Invest.* – 2003. – T. 112. – № 11. – C. 1732-1740.
240. Zhao, Y. Salvianolic acid B inhibits atherosclerosis and TNF- $\alpha$ -induced inflammation by regulating NF- $\kappa$ B/NLRP3 signaling pathway / Y. Zhao, C. Shao, H. Zhou [et al.] // *Phytomedicine.* – 2023. – T. 119. – C. 155002.
241. Zhou, R. Neutrophil extracellular traps aggravate neutrophil reverse transendothelial migration during traumatic brain injury / R. Zhou, T. Zhang, J. Sun [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2025. – T. 778. – C. 152387.
242. Zhou, Y. Leukotriene B4-induced neutrophil extracellular traps impede the clearance of *Pneumocystis* / Y. Zhou, S. Deng, C. Du [et al.] // *Eur J Immunol.* – 2024. – T. 54. – № 5. – C. e2350779.
243. Zhu, J. Association between neutrophil-platelet ratio and 28-day mortality in patients with sepsis: a retrospective analysis based on MIMIC-IV database / J. Zhu, C. Zhang, Z. Deng [et al.] // *BMC Infect Dis.* – 2025. – T. 25. – № 1. – C. 685.
244. Zong, L. Lipoxin A4 reverses mesenchymal phenotypes to attenuate invasion and metastasis via the inhibition of autocrine TGF- $\beta$ 1 signaling in pancreatic

cancer / L. Zong, K. Chen, Z. Jiang [et al.] // J Exp Clin Cancer Res. – 2017. – T. 36. – C. 181.