https://doi.org/10.15360/1813-9779-2025-3-2568

OPEN ACCESS (cc) BY

Оценка структурных изменений мембран нейтрофилов под действием плазмы от новорожденных пациентов с инфекцией

В. А. Иноземцев[1], И. В. Образцов[2], Е. А. Шерстюкова[1]*,
С. С. Кандрашина[1], М. А. Шведов[1], М. Е. Докукин[1], В. А. Сергунова[1]

[1] НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского,
Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии,
Россия, 10703, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2
[2] Детская городская клиническая больница №9 им. Г. Н. Сперанского Департамента здравоохранения г. Москвы,
Россия, 123317, г. Москва, Шмитовский пр-д, д. 29

Для цитирования: *В. А. Иноземцев, И. В. Образцов, Е. А. Шерстюкова, С. С. Кандрашина, М. А. Шведов, М. Е. Докукин, В. А. Сергунова.* Оценка структурных изменений мембран нейтрофилов под действием плазмы от новорожденных пациентов с инфекцией. *Общая реаниматология.* 2025; 21 (3): 41–50. https://doi.org/10.15360/1813-9779-2025-3-2568 [На русск. и англ.]

***Адрес для корреспонденции:** Екатерина Александровна Шерстюкова, kmanchenko@yandex.ru

Резюме

Цель исследования: выявить характеристики мембран нейтрофилов, которые могут стать клиническими биомаркерами развития инфекционно-септических осложнений у новорожденных.

Материалы и методы. Объектом исследования были нейтрофилы, выделенные из крови здоровых доноров. Проводили инкубацию клеток с плазмой новорожденных, разделенных на три группы: условно-здоровые (NS) (n=6), с локальной (LIS) (n=7) и генерализованной (GIS) инфекцией (n=8). Оценивали морфологию клеток и шероховатость мембран до и после стимуляции форбол-12-миристат-13-ацетатом (PMA) с использованием флуоресцентной и атомно-силовой микроскопии. Определяли площади ядер и мембран нейтрофилов, степень активации к образованию внеклеточных нейтрофильных ловушек (NET), а также параметр шероховатости мембраны (R_a).

Результаты. Разработали и стандартизировали методику подготовки и оценки нейтрофилов. В ходе экспериментов оптимизировали условия среды: 1% раствор бычьего сывороточного альбумина (BSA) обеспечил минимальную фоновую активацию клеток. Выявили дозозависимую активацию нейтрофилов PMA при 1% содержании плазмы. После стимуляции PMA наблюдали значительное увеличение площадей ядер (p<0,001) и мембран (p<0,001), а также шероховатости поверхности (p<0,001), независимо от типа плазмы. Наиболее выраженные изменения отметили у клеток, инкубированных с плазмой пациентов группы GIS. Установили, что при генерализованной инфекции увеличивается склонность нейтрофилов к NET-активации, что может лежать в основе патогенеза тромботических осложнений при сепсисе.

Заключение. Характеристики нейтрофилов, выявленные с помощью микроскопических методов, могут служить перспективными биомаркерами степени тяжести инфекционно-септического процесса у новорожденных.

Ключевые слова: мембраны нейтрофилов; новорожденные; инфекционно-септические осложнения; сепсис; внеклеточные нейтрофильные ловушки; шероховатость мембран; атомно-силовая микроскопия; флуоресцентная микроскопия

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Assessment of Structural Changes in Neutrophil Membranes Induced by Plasma from Newborns with Infection

Vladimir A. Inozemtsev[1], Igor V. Obraztsov[2], Ekaterina A. Sherstyukova[1]*,
Snezhanna S. Kandrashina[1], Mikhail A. Shvedov[1], Maxim E. Dokukin[1], Viktoria A. Sergunova[1]

[1] V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology,
Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology,
25 Petrovka Str., Bldg. 2, 107031 Moscow, Russia
[2] G.N. Speransky Children's City Clinical Hospital No. 9, Moscow Health Department,
29 Shmitovsky pr., 123317 Moscow, Russia

Summary

This study aimed to identify neutrophil membrane characteristics that could serve as clinical biomarkers for the development of infectious complications in newborns.

Materials and Methods. Neutrophils isolated from healthy donors were used as a model system. The cells were incubated with plasma samples (S) isolated from blood of newborns categorized into three groups: apparently healthy (normal) (NS) (N=6), with localized infection (LIS) (N=7), and with generalized

infection (GIS) (*N*=8). We assessed cellular morphology and membrane roughness before and after stimulation with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) using fluorescence and atomic force microscopy. We quantified nuclear and membrane surface areas, the intensity of neutrophil extracellular trap (NET) formation, and membrane arithmetic average roughness (R_a).

Results. A standardized protocol for neutrophil preparation and evaluation was developed. Optimal incubation conditions were established; 1% bovine serum albumin (BSA) yielded minimal background activation. Dose-dependent activation of neutrophils by PMA was observed in the presence of 1% plasma. PMA stimulation significantly increased nuclear area ($P<0.001$), membrane area ($P<0.001$), and R_a ($P<0.001$), regardless of plasma sample group. The most significant changes occurred in neutrophils incubated with plasma from the GIS group. Generalized infection was associated with enhanced NET activation, which may contribute to the pathogenesis of thrombotic complications in neonatal sepsis.

Conclusion. Microscopy-based neutrophil characteristics are promising biomarkers for evaluating infection including sepsis in newborns.

Keywords: neutrophil membranes; newborns; infectious and septic complications; sepsis; neutrophil extracellular traps; membrane roughness; atomic force microscopy; fluorescence microscopy

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Информация об авторах/ Information about the authors:

Владимир Александрович Иноземцев/Vladimir A. Inozemtsev: http://orcid.org/0000-0002-4693-5624

Игорь Владимирович Образцов/Igor V. Obraztsov: http://orcid.org/0000-0002-6649-853X

Екатерина Александровна Шерстюкова/Ekaterina A. Sherstyukova: http://orcid.org/0000-0002-9962-6315

Снежанна Сергеевна Кандрашина/Snezhanna S. Kandrashina: http://orcid.org/0000-0002-2185-3817

Михаил Алексеевич Шведов/Mikhail A. Shvedov: http://orcid.org/0009-0004-4288-2758

Максим Евгеньевич Докукин/Maxim E. Dokukin: http://orcid.org/0000-0001-6856-1953

Виктория Александровна Сергунова/Viktoria A. Sergunova: http://orcid.org/0000-0002-8425-0845

Read the full-text English version at www.reanimatology.com

Введение

Воспаление является универсальным патологическим процессом, инициируемым в ответ на воздействие инфекционных агентов, механических или термических повреждений, а также значительных хирургических вмешательств [1, 2]. По последним эпидемиологическим данным за 2019–2020 гг., заболеваемость сепсисом в развитых странах составляет около 750 пациентов на 100 000 населения в Европейском регионе [3].

Неонатальный сепсис остается одной из актуальных проблем в медицине из-за высокой летальности и рефрактерности к терапии, что связано с дефицитом врожденного иммунитета, включая нарушение функциональной активности нейтрофилов и моноцитов [4–6].

Исследования показывают, что при сепсисе и сочетанном генезе полиорганной недостаточности у новорожденных наблюдается повышенная экспрессия CD64 и сниженная экспрессия CD16 на нейтрофилах, что является важным диагностическим биомаркером [7].

Стимуляция нейтрофилов как физиологическими, так и фармакологическими агентами, такими как перекись водорода, липополисахариды (LPS), форбол-12-миристат-13-ацетат (PMA) и ионофор кальция A23187, не только активирует их эффекторные функции, но также вызывает значительные изменения в их морфологии, так клетка может переходить из сферической формы в распластанную. Этот процесс является важной частью адаптации клеток к выполнению их защитных функций [8–13].

Современные исследования показали, что септическая сыворотка оказывает значительное влияние на нейтрофилы, включая их активацию, апоптоз и изменение функциональных свойств [14, 15].

Эти данные подчеркивают важность изучения модулирующих факторов, способных снизить негативное влияние септической сыворотки на нейтрофилы, для разработки новых подходов к терапии сепсиса [16].

В данном исследовании проводился комплексный анализ изменений, происходящих в нейтрофилах с применением современных методов микроскопии.

Несмотря на большое количество проведенных исследований, многие аспекты структуры и функций нейтрофилов остаются неизученными. Современные оптические методы пока не позволяют в полной мере раскрыть механизмы функционирования нейтрофилов и детально изучить внутриклеточные процессы [14]. В последнее время метод атомно-силовой микроскопии (АСМ) все активнее используется для исследования биологических образцов [17, 18] и, в частности, клеток [19–22]. Особенность АСМ заключается в том, что с его помощью можно получать как топографические изображения, так и карты физических свойств клеточной поверхности с высоким разрешением [23, 24], что позволяет использовать его как инструмент для поиска биофизических маркеров.

Цель исследования — выявить характеристики мембран нейтрофилов, которые могут стать клиническими биомаркерами развития инфекционно-септических осложнений у новорожденных.

Материал и методы

В исследовании использовали нейтрофилы, выделенные из периферической крови здорового взрослого донора. Все экспериментальные процедуры, включая забор и анализ биоматериалов, проводили в строгом соответствии с международными этическими стандартами, установленными Хельсинкской декларацией (2000 г.) о принципах проведения медицинских исследований, а также Конвенцией Совета Европы о правах человека и биомедицине (1999 г.). Исследования осуществляли в рамках нормативных требований и регламентов Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии (протокол № 427 от 17.10.2023), одобренных локальным этическим комитетом Детской городской клинической больницы № 9 им. Г. Н. Сперанского Департамента здравоохранения г. Москвы (протокол № 45 от 31.05.2022).

На первом этапе выделения нейтрофилов свежую донорскую кровь наслаивали на двойной градиент Фиколла (Paneco, Россия) с плотностями 1,119 г/см³ и 1,077 г/см³. Центрифугирование проводили при 400×g в течение 40 мин при комнатной температуре. После этого отбирали фракцию, содержащую нейтрофилы с примесью эритроцитов. Для удаления эритроцитов проводили их лизис в ледяной воде (30 с), после чего добавляли двукратный фосфатно-солевой буфер (PBS) для восстановления осмотического баланса [25, 26]. Выделенные нейтрофилы ресуспендировали в PBS для подсчета. По данным световой микроскопии, чистота нейтрофильной фракции превышала 98%, жизнеспособность клеток, оцененная с использованием трипанового синего, составляла более 96%.

Эксперименты проводили в 24-луночных планшетах с размещенными в лунках стерильными круглыми покровными стеклами. Для адгезии клеток нейтрофилы (2×10^5 клеток/мл) ресуспендировали в среде, состоящей из RPMI 1640 (Paneco, Россия), дополненной 10 мМ HEPES (Paneco, Россия). После этого клеткам давали адгезировать к стеклу в течении 30 мин при 37°C в атмосфере 5% CO_2.

Во всех проведенных экспериментах использовали образцы плазмы от условно-здоровых новорожденных пациентов (NS) (отсутствие подтвержденных инфекционно-воспалительных осложнений, n=6), новорожденных пациентов с локальной инфекцией (LIS) (наличие лабораторно-инструментально подтвержденного очага инфекции при отсутствии органной недостаточности, n=7), новорожденных пациентов с генерализованной инфекцией (GIS) (наличие лабораторно-инструментально подтвержденного очага инфекции и органной недостаточности (балл pSOFA>8), n=8). Всего в эксперименте исследовали 21 образец плазмы.

В предварительном эксперименте по подбору среды сравнивали базовую среду, и базовую среду с добавлением фетальной бычьей сыворотки (FBS) 1% (Paneco, Россия), или добавлением термически инактивированной фетальной бычьей сыворотки (hiFBS) 1% (Paneco, Россия), или добавлением бычьего сывороточного альбумина (BSA) 1% (Paneco, Россия). Время инкубации составляло 3 ч. В дальнейшем среду RPMI 1640, дополненную 10 мМ HEPES и с 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA) (Paneco, Россия) использовали в качестве базовой среды.

Для подбора концентрации плазмы к базовой среде добавляли 1, 10 или 50% плазмы от условно-здоровых пациентов. После чего активировали клетки с помощью 25 нМ PMA в течении 3 ч.

Для подбора концентрации активатора к среде добавляли 1, 10 или 50% нормальной плазмы или септической плазмы. После чего активировали клетки с помощью 5 нМ, 10 нМ, 25 нМ PMA 3 ч.

В основном эксперименте нейтрофилы инкубировали с базовой средой, дополненной 1% плазмой от пациентов разного типа. Для оценки активации нейтрофилов использовали 25 нМ PMA. Время инкубации клеток составляло 3 ч.

По завершении эксперимента клетки фиксировали 4% раствором параформальдегида при 37°C в течение 30 мин, после чего трижды промывали 1×PBS.

Изучение клеточной морфологии и анализ шероховатости поверхности нейтрофилов проводили с использованием АСМ [27]. Перед сканированием образцы трижды промывали дистиллированной водой (по 30 с) для удаления солей [28], после чего высушивали в вакуумном осушителе Jeio Tech VDC-11U (Jeio Tech, Республика Корея) при давлении 1×10^{-3} МПа в течение 1 ч.

Для получения 2D и 3D изображений сканирование выполняли в полуконтактном режиме на микроскопах NTEGRA Prima и NTEGRA BIO (NT-MDT SI, Россия). Использовали кантилеверы NSG01 (NT-MDT SI, Россия) с жесткостью 5 Н/м и радиусом зонда 10 нм. Сканирование проводили при различных параметрах: площади сканирования составляли 100×100 мкм² и 2×2 мкм², количество точек — 512, частота — от 0,3 до 0,7 Гц.

Для анализа изображений применяли программные пакеты Gwyddion 2.65 и Image Analysis (NT-MDT SI, Россия). Оценку шероховатости поверхности (Ra) клеток проводили при параметре cut-off 0,440 мкм, обеспечивающем максимальную чувствительность метода и позволяющем корректно анализировать все изображения, полученные в рамках исследования.

Широкопольную флуоресцентную микроскопию применяли для оценки активации нейтрофилов, а также для измерения площади клеточной мембраны и ядра. Исследования проводили с использованием микроскопа Thunder (Leica Microsystems, Германия), оснащенного светодиодным источником возбуждения и ×63 объективом с масляной иммерсией.

Обработку изображений осуществляли с помощью программ LAS X (Leica Microsystems, Германия) и ImageJ [29]. Последнюю использовали для количественной оценки активации клеток и измерения площадей клеточных структур.

Для проведения широкопольной флуоресцентной микроскопии нейтрофилы фиксировали и пермеабилизировали в 0,05% растворе Тритона X-100 (Sigma, США) в PBS в течение 5 мин при 4°C, затем промывали PBS и инкубировали с 3% BSA для блокирования неспецифического связывания.

Для окрашивания ДНК применяли краситель Hoechst 33342 (Sigma, США), разведенный 1:1000 в PBS, с инкубацией в течение 30 мин. Мембрану нейтрофилов визуализировали с использованием Alexa Fluor 594-конъюгированного WGA (Thermo Fisher Scientific, США) в разведении 1:500, f-актин — с помощью Alexa Fluor 488-конъюгированного фаллоидина (Thermo Fisher Scientific, США) в том же разведении. Все этапы окрашивания проводили в темноте. По завершении инкубации покровные стекла трижды промывали PBS, после чего размещали на предметные стекла и фиксировали с применением монтирующей среды ibidi (Ibidi, Германия).

Данные обработали статистически с использованием программного обеспечения OriginPro 2019 (OriginLab Corporation, США). Все количественные показатели представили в виде медианы (*Me*) и интерквартильного размаха (*Q1*; *Q3*). Для оценки характера распределения использовали критерий Шапиро–Уилка. Поскольку большинство исследуемых параметров не соответствовали нормальному распределению, применили непараметрические методы анализа. Для сравнения двух независимых выборок использовали *U*-критерий Манна–Уитни. При анализе парных зависимых данных — критерий Уилкоксона. Три независимые группы сопоставляли, используя критерий Краскела–Уоллиса, в последующем — множественный тест Данна для пост-хок анализа. Статистически значимыми считали различия при уровне значимости $p<0,05$ (двусторонний критерий).

Результаты и обсуждение

Первую часть исследования направили на подбор оптимальных условий для проведения основного эксперимента. В качестве базовой среды использовали среду RPMI, дополненную HEPES. Определяли дополнительные компоненты среды, оптимальные концентрации плазмы новорожденных пациентов, а также рабочую концентрацию PMA.

В рамках подготовительного эксперимента сравнили влияние 1% FBS, 1% инактивированной плазмы, 1% BSA, а также базовой среды на состояние нейтрофилов. В ходе эксперимента оценили морфологическое состояние нейтрофилов в этих средах. Инкубация нейтрофилов только в базовой среде приводила к их повсеместной адгезии к стеклу, что свидетельствует о преждевременной активации клеток. FBS 1%, hiFBS 1%, BSA 1% подавляли преждевременную активацию в одинаковом соотношении (рис. 1, *a*).

BSA 1% продемонстрировал наиболее подходящее снижение адгезии нейтрофилов в наших условиях.

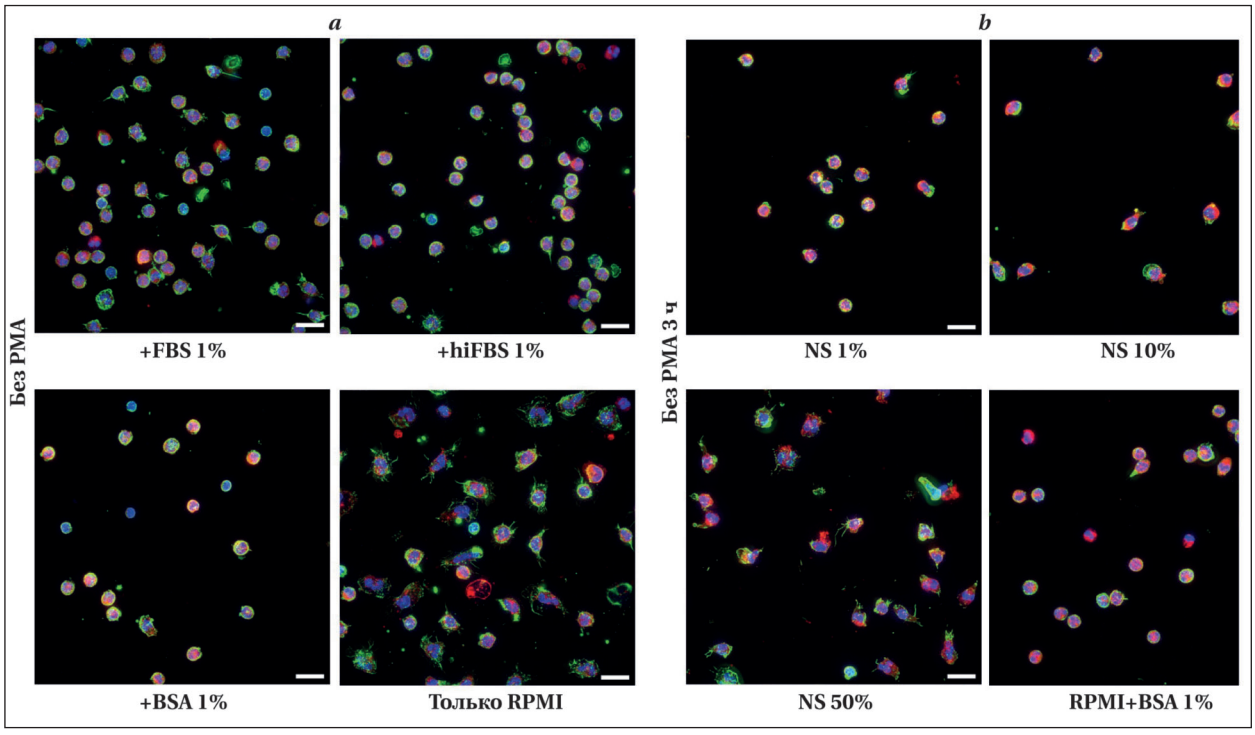

Рис. 1. Флуоресцентные изображения нейтрофилов в различных условиях инкубации: влияние компонентов среды (*a*) и концентрации плазмы (*b*).
Примечание. Синий — ядро; зеленый — f-actin; красный — мембрана; шкала: 20 мкм. FBS — фетальная бычья сыворотка; hiFBS — термически инактивированная фетальная бычья сыворотка; BSA — бычий сывороточный альбумин; NS —плазма от условно-здоровых новорожденных пациентов.

Для подбора оптимальной дозы плазмы новорожденных пациентов провели исследование воздействия на нейтрофилы разного процентного содержания плазмы условно-здорового пациента (рис. 1, *b*). Сравнивали воздействие на нейтрофилы 1, 10, 50% содержания нормальной плазмы пациентов и базовой среды. Типовые изображения нейтрофилов показали на рис. 1, *b*.

Добавление 1% плазмы в рабочую среду обеспечило наилучшее сохранение нейтрофилов в интактном состоянии, тогда как концентрации 10 и 50% способствовали их адгезии к поверхности.

Нейтрофилы активировали с помощью PMA. В работах по изучению нейтрофильных внеклеточных ловушек PMA используют в различных концентрациях, в диапазоне от 1 нМ до 100нМ. Под оптимальной концентрацией подразумевается минимальная концентрация PMA при которой, в условиях добавления плазмы, происходит активация клеток. Изображения нейтрофилов как контрольных клеток, так и клеток после активации показали на рис. 2.

По данным флуоресцентной микроскопии провели расчет количества нейтрофилов, активированных на выброс внеклеточных ловушек (NET), в каждой из групп. Из полученных данных получили, что большая концентрация плазмы, вне зависимости от ее типа, ингибирует NET-активацию нейтрофилов. Наилучший результат продемонстрировала концентрация сыворотки 1%.

Количество NET-активированных клеток рассчитывали исходя из их морфологии и состояния ядра. Пример флуоресцентных изображений, по которым проводили обсчет, представили на рис. 3, *a, b*.

NET-активированными считали клетки, у которых:

1) нарушена сегментоядерная форма ядра (ядро могло быть или в виде большого «облака» без признаков структуры, или в виде вытянутой «стрелы»;

2) нет признаков сохранения актинового цитоскелета (наличие цитоскелета один из косвенных признаков того, что клетка функциональна);

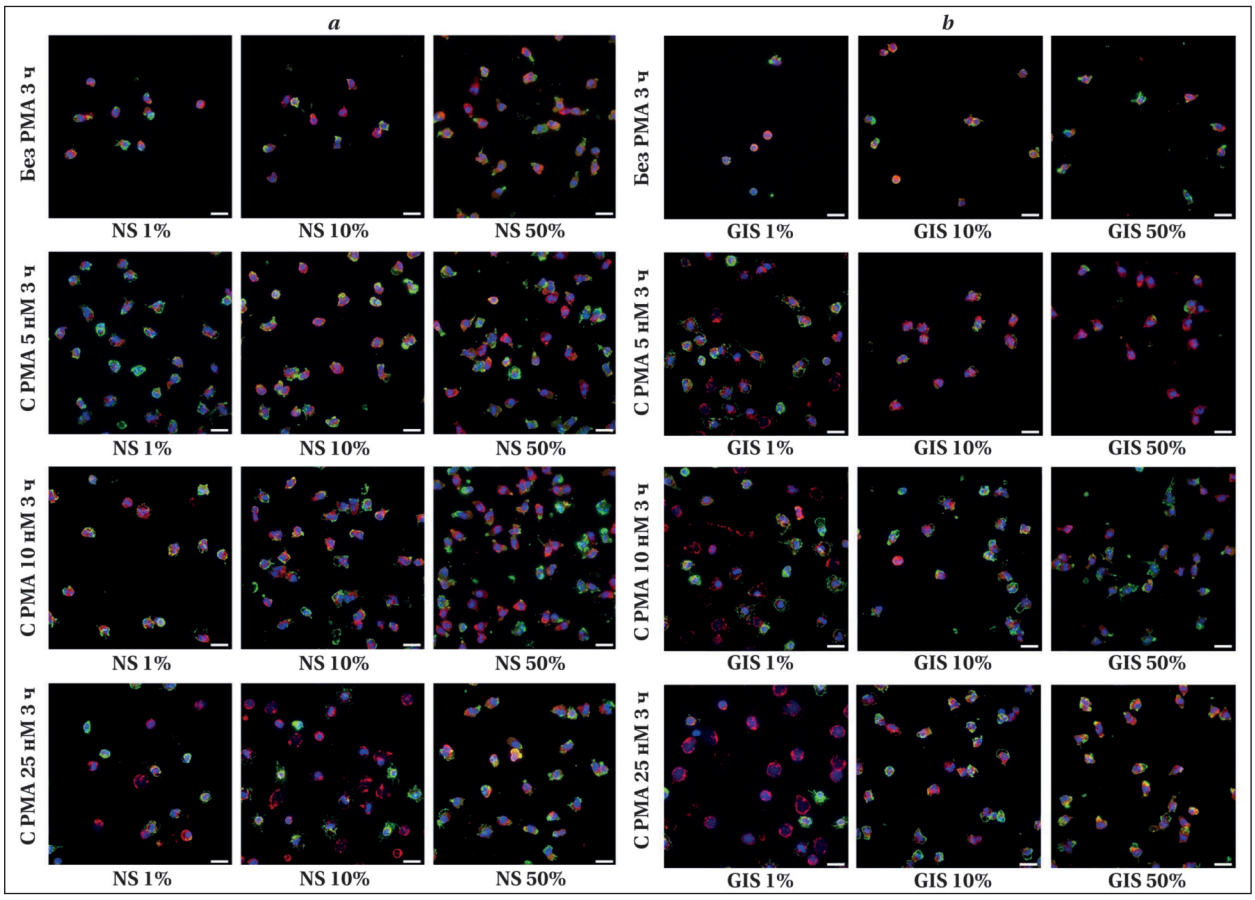

Рис. 2. Флуоресцентные изображения нейтрофилов в рабочей среде с добавлением плазмы условно-здорового пациента с разной концентрацией PMA.

Примечание. *a* — контрольные нейтрофилы; *b* — нейтрофилы после активации; синий — ядро, зеленый — f-actin, красный — мембрана; шкала: 20 мкм. NS — плазма от условно-здоровых новорожденных пациентов; GIS — плазма от новорожденных пациентов с генерализованной инфекцией.

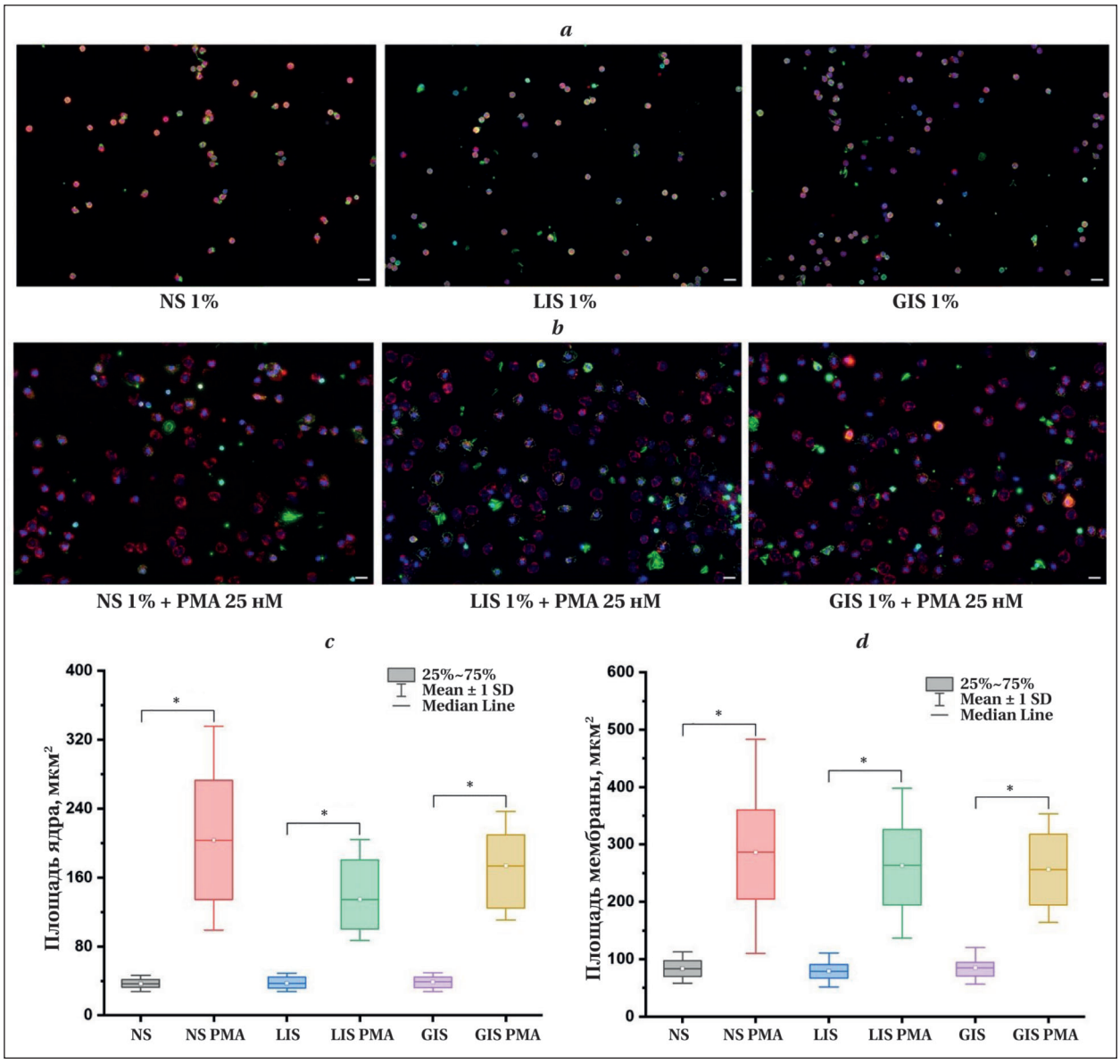

Рис. 3. Влияние различных типов плазмы на морфологические изменения нейтрофилов при стимуляции PMA.
Примечание. *a, b* — флуоресцентные изображения нейтрофилов после инкубации с 1% плазмой различных типов без стимуляции (*a*) и с добавлением активатора PMA; синий — ядро; зеленый — f-actin; красный — мембрана; шкала: 20 мкм. *c, d* — графики изменения площадей ядер нейтрофилов и их мембран в различных условиях; * — $p<0{,}001$. NS — плазма от условно-здоровых новорожденных пациентов; LIS — плазма от новорожденных пациентов с локальной инфекцией; GIS — плазма от новорожденных пациентов с генерализованной инфекцией. Указаны статистически значимые различия внутри групп ($p<0{,}001$).

3) мембрана не представляет собой целостную структуру.

Остальные клетки — это неактивированные клетки (интактные), — круглые, овальные нейтрофилы диаметром 6–9 мкм, с сегментированным ядром и кортикальным актином, или адгезированные клетки, также с сегментированным ядром, но распластанные по поверхности стекла, с ярко выраженными филоподиями.

Провели анализ морфологических изменений нейтрофилов после инкубации с различными типами плазмы и добавлением активатора PMA. Для этого проанализировали полученные флуоресцентные изображения и рассчитали площади ядер и цитоплазматических мембран нейтрофилов, поскольку известно [26], что при NET-активации происходит набухание ядра и увеличение размеров клеток (рис. 3, *c, d*). После стимуляции PMA зафиксировали значительное увеличение площади ядер: в группе NS с 37 (33; 42) до 203 (135; 273) мкм² ($p<0{,}001$), в группе LIS с 37 (32; 44) до 134 (101; 180) мкм² ($p<0{,}001$), в группе GIS с 39 (32; 44) до 173 (124; 210) мкм² ($p<0{,}001$). Аналогичную динамику отметили и для площади мембраны нейтрофилов: в группе NS с 83 (70; 97) до 286 (205; 361) мкм²

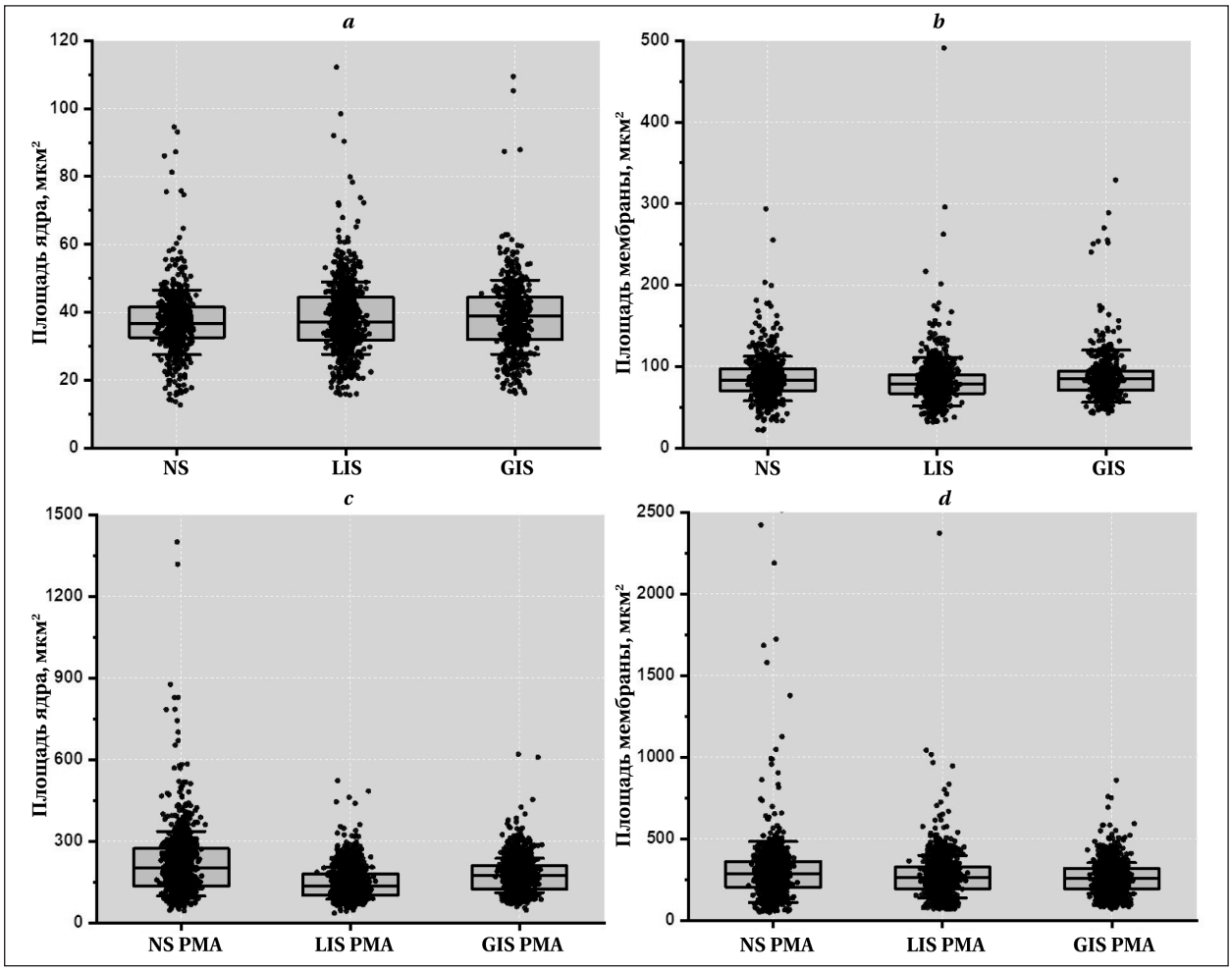

Рис. 4. Графики изменения площадей ядер нейтрофилов и их мембран.
Примечание. *a, b* — значения до добавления активатора PMA; *c, d* — значения после добавления активатора PMA.

(p<0,001), в группе LIS с 79 (67; 90) до 263 (194; 326) мкм² (p<0,001), в группе GIS с 85 (70; 95) до 256 (195; 318) мкм² (p<0,001).

Из приведенных графиков установили, что нейтрофилы, не подвергшиеся активации, сохраняли сегментоядерную структуру ядра и сферическую форму. После стимуляции PMA нейтрофилы демонстрировали выраженное увеличение площади как ядра, так и мембраны. При этом значения морфологических параметров заметно варьировали внутри одной и той же группы плазмы, что указывает на различия в характере ее воздействия на клетки. Несмотря на эту вариабельность, общую направленность морфологических изменений при NET-активации удалось проследить во всех исследованных образцах.

На рис. 4 представили графики распределения всех значений площадей ядер и мембран нейтрофилов до и после стимуляции PMA в зависимости от типа плазмы. До стимуляции PMA нейтрофилы, инкубированные с плазмой новорожденных пациентов с генерализованной инфекцией, демонстрировали значительное увеличение площади ядра по сравнению с клетками, обработанными плазмой контрольной группы (χ^2=9,366; p=0,009).

После активации PMA характер распределения значений изменился. Наибольшую площадь ядра зарегистрировали у нейтрофилов, инкубированных с плазмой условно-здоровых новорожденных. По уменьшению площади ядра за ними следовали клетки, взаимодействовавшие с плазмой пациентов группы GIS, а затем — с плазмой пациентов с локализованной инфекцией (χ^2=339,295; p<0,001).

Сходную тенденцию наблюдали и при оценке площади мембраны. До активации PMA минимальные значения данного показателя зафиксировали у нейтрофилов, инкубированных с плазмой пациентов группы LIS (χ^2=26,396; p<0,001). Однако после стимуляции PMA наибольшую площадь мембраны продемонстрировали клетки, обработанные плазмой контрольной группы (χ^2= 37,663; p<0,001).

На рис. 5 представили значения средней шероховатости мембран нейтрофилов, измеренные с помощью АСМ. При сравнении групп

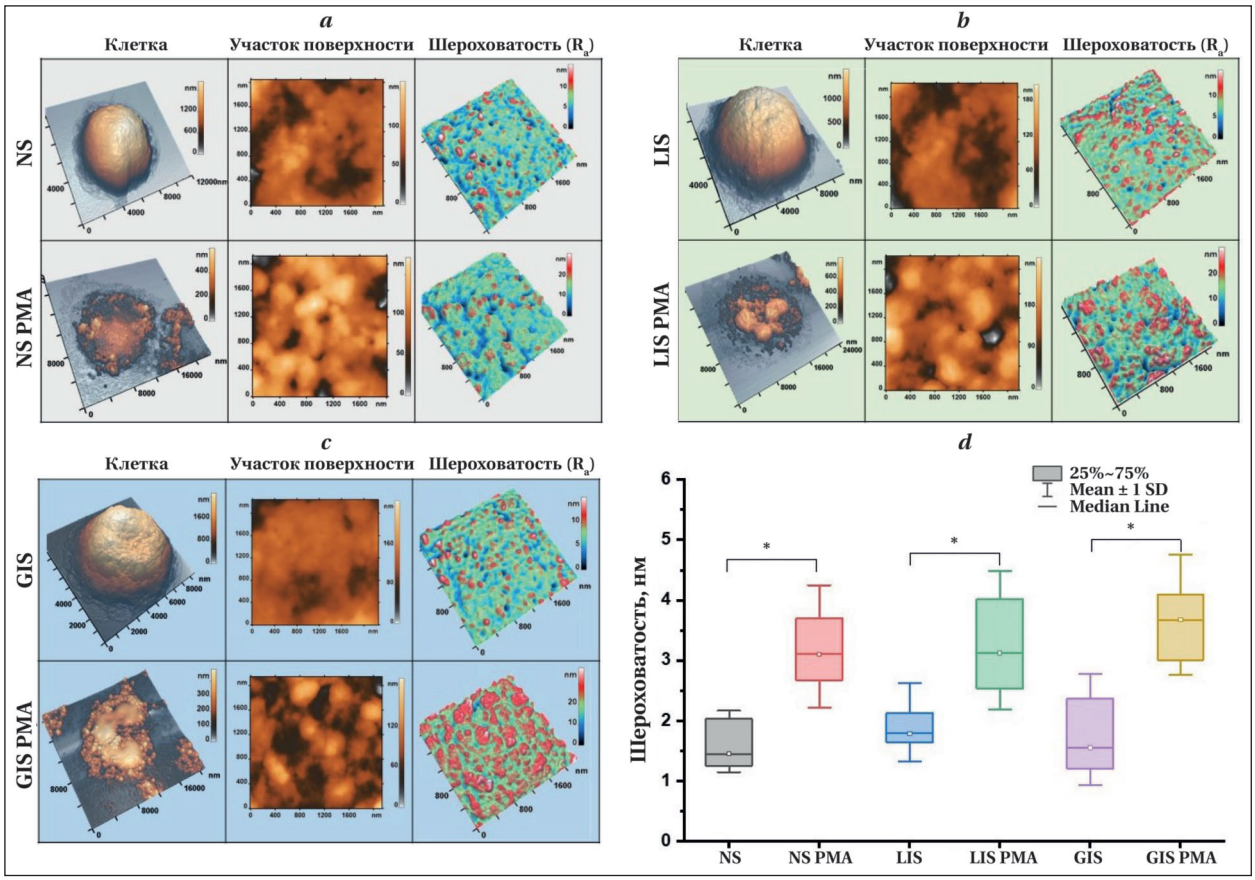

Рис. 5. АСМ-изображения нейтрофилов и анализ шероховатости мембран после воздействия плазмы из различных групп.

Примечание. *a–c* — 3D изображения нейтрофилов (первый столбец), фрагментов мембранной поверхности (второй столбец) и соответствующие карты шероховатости R_a (третий столбец), полученные с помощью АСМ после инкубации клеток с плазмой из контрольной группы (NS), а также пациентов с локализованной (LIS) и генерализованной (GIS) инфекцией — до и после стимуляции PMA; *d* — график изменения средней шероховатости поверхности мембран для всех исследуемых групп; * — $p<0{,}001$. Указаны статистически значимые различия внутри групп ($p<0{,}001$).

без активации PMA нейтрофилы, инкубированные с плазмой условно-здорового донора, с плазмой пациентов с локализованной инфекцией и с плазмой пациентов с генерализованной инфекцией, продемонстрировали сопоставимые значения шероховатости. Значения R_a составили 1,4 (1,2; 2,0) нм для NS, 1,8 (1,6; 2,1) нм для LIS и 1,5 (1,2; 2,4) нм для GIS. Различия между группами не достигли статистической значимости (χ^2= 4,001; p=0,135).

С помощью АСМ получили детальные изображения поверхности нейтрофилов (рис. 5, *a–c*), по которым провели анализ клеточной поверхности.

После активации PMA морфология мембраны изменилась. Во всех исследуемых группах наблюдали значимое увеличение Ra по сравнению с соответствующими контрольными значениями. Нейтрофилы, обработанные плазмой из группы NS в присутствии PMA, продемонстрировали увеличение R_a до 3,1 (2,7; 3,7) нм. В группах LIS PMA и GIS PMA значения достигли соответственно 3,1 (2,5; 4,0) нм и 3,7 (3,0; 4,0) нм. Несмотря на общую тенденцию к росту, при сравнении между группами уровень значимости составил p=0,072 (χ^2=5,255), что не указывает на значимые различия между ними. Однако при парном сравнении каждой активированной группы с соответствующей неактивированной плазмой статистически значимые различия зафиксировали во всех случаях ($p<0{,}001$), что подтверждает влияние активации на параметры шероховатости мембраны.

Увеличение R_a свидетельствует о повышенной гетерогенности поверхности нейтрофилов после активации. Кроме того, в процессе активации отметили значительное расширение латеральных размеров клеток, что согласуется с известными морфологическими признаками NET-активации.

Из полученных с помощью флуоресцентной микроскопии данных следует, что все исследуемые образцы плазмы, вне зависимости от пациента, не оказывали негативного действия на морфологию нейтрофилов. В группе контроля, без добавления активатора, подавляющее большинство клеток сохраняли интактную форму.

При инкубации клеток с плазмой пациентов с локальной инфекцией получили наименьший ответ на стимул по показателям площади ядра. При этом нейтрофилы, инкубированные с плазмой пациентов с генерализованной инфекцией, характеризовались уровнем NET-активации, сопоставимым с контрольной группой. Таким образом, мы наблюдали, что профиль растворимых факторов плазмы при локальном инфекционном процессе способствует стабилизации нейтрофилов в циркуляторном русле, в то время как при развитии и генерализации инфекции нейтрофилы становятся более подверженными формированию хроматиновых сетей, что приводит к риску тромбозов и синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови у пациентов с сепсисом [30].

Результаты АСМ-анализа подтвердили, что плазма, независимо от ее происхождения, не оказывали выраженного повреждающего воздействия на нейтрофилы. Нейтрофилы, инкубированные с различными типами плазмы без стимуляции, сохраняли сопоставимые значения шероховатости мембран, что свидетельствует об отсутствии значимых различий в их структурном состоянии.

После активации PMA клетки, обработанные всеми типами плазмы, демонстрировали схожее увеличение параметра R_a, что указывает на одинаковую степень повышения гетерогенности поверхности мембраны. Таким образом, активация NET-образования вызывала аналогичные морфологические изменения клеточной поверхности вне зависимости от типа плазмы.

К ограничениям исследования следует отнести малый размер выборки, а также отсутствие характеристики фенотипических изменений нейтрофилов после инкубации с плазмой новорожденных с различной выраженностью инфекционно-септических осложнений.

Заключение

Полученные в ходе эксперимента данные представляют интерес для понимания механизмов изменений нейтрофилов при инфекционно-септических осложнениях у новорожденных, что может способствовать разработке новых диагностических и терапевтических подходов. Показали различное воздействие плазмы на NET-активацию нейтрофилов в зависимости от степени выраженности инфекционно-септического процесса.

Для дальнейшего развития исследования возможно включение дополнительных биохимических и биофизических анализов или применение методов проточной цитофлуориметрии для анализа состава плазмы, которые могут дополнить исследование пониманием молекулярных механизмов реакции нейтрофилов на плазму и активацию.

Таким образом, методика и ее дальнейшая оптимизация открывают перспективы для углубленного изучения патофизиологических процессов, связанных с изменениями нейтрофилов при сепсисе. Выявленные индуцированные изменения характеристик мембраны нейтрофилов после инкубации с плазмой новорожденных могут стать клиническими биомаркерами различной выраженности инфекционно-септических процессов.

Благодарности. Авторы выражают искреннюю признательность сотрудникам Центра коллективного пользования по биологии развития на основе использования клеточных технологий и оптических методов исследования Института биологии развития им. Н. К. Кольцова Российской Академии наук (ЦКП ИБР им. Н. К. Кольцова РАН), в частности, руководителю ЦКП доктору биологических наук Елене Евгеньевне Воронежской за помощь в работе с флуоресцентной микроскопией.

Литература

1. *Liu D., Huang S. Y., Sun J. H., Zhang H. C., Cai Q. L., Gao C., Li L., et al.* Sepsis-induced immunosuppression: mechanisms, diagnosis and current treatment options. *Mil Med Res.* 2022; 9 (1): 56. DOI: 10.1186/s40779-022-00422-y. PMID: 36209190.
2. *Понасенко А. В., Синицкий М. Ю., Хуторная М. В., Барбараш О. Л.* Генетические макеры системной воспалительной реакции в кардиохирургии (обзор). *Общая реаниматология.* 2017; 13 (6): 48–59. *Ponasenko A. V., Sinitsky M. Y., Khutornaya M. V., Barabash O. L.* Genetic markers of systemic inflammatory response in cardiac surgery (Review). *Gen Reanimatol = Obshchaya Reanimatologiya.* 2017; 13 (6): 48–59. (in Russ.&Eng.). DOI: 10.15360/1813-9779-2017-6-48-59.
3. *Mellhammar L., Wollter E., Dahlberg J., Donovan B., Olséen C.-J., Wiking P. O., Rose N., et al.* Estimating sepsis incidence using administrative data and clinical medical record review. *JAMA Netw Open.* 2023; 6 (8): e2331168. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2023.31168. PMID: 37642964.
4. *Образцов И. В., Рябов А. Ю., Цуранова Н. С., Балыкова Е. В., Парамонов А. И.* Функциональная активность нейтрофилов у пациентов с послеоперационными инфекционно-септическими осложнениями. *Российский иммунологический журнал.* 2019; 22 (4): 1393–401. *Obraztsov I. V., Ryabov A.Yu., Tsuranova N. S., Balykova E. V., Paramonov A. I.* Neutrophil function in patients with postsugery infectious septic complications. *Russian Journal of Immunology = Ross Immunol Zhurnal.* 2019; 22 (4): 1393–1401. (in Russ.). DOI: 10.31857/S102872210007042-1.
5. *Celik I. H., Hanna M., Canpolat F. E., Mohan Pammi.* Diagnosis of neonatal sepsis: the past, present and future. *Pediatr Res.* 2022; 91 (2): 337–350. DOI: 10.1038/s41390-021-01696-z. PMID: 34728808.
6. *Glaser M. A., Hughes L. M., Jnah A., Newberry D.* Neonatal sepsis: a review of pathophysiology and current management strategies. *Adv Neonatal Care.* 2021; 21 (1): 49–60. DOI: 10.1097/ANC.0000000000000769. PMID: 32956076.
7. *Образцов И. В., Жиркова Ю. В., Черникова Е. В., Крапивкин А. И., Брунова О. Ю., Абдраисова А. Т., Давыдова Н. В.* Значение функционального анализа фагоцитов для диагностики неонатального сепсиса. *Российский вестник перинатологии и педиатрии.* 2023; 68 (1): 24–29. *Obraztsov I. V., Zhirkova Y. V., Chernikova E. V., Krapivkin A. I., Brunova O. Y., Abdraisova A. T., Davydova N. V.* Feasibility of phagocytes functional testing in neonatal sepsis diagnostics. *Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics = Rossiyskiy Vestnik Perinatologii i Pediatrii.* 2023; 68 (1): 24–29. (in Russ.). DOI: 10.21508/1027-4065-2023-68-1-24-29.

8. *Ohbuchi A., Kono M., Kitagawa K., Takenokuchi M., Imoto S., Saigo K.* Quantitative analysis of hemin-induced neutrophil extracellular trap formation and effects of hydrogen peroxide on this phenomenon. *Biochem Biophys Reports*. 2017; 11: 147–153. DOI: 10.1016/j.bbrep.2017.07.009. PMID: 28955779.
9. *Parker H., Winterbourn C. C.* Reactive oxidants and myeloperoxidase and their involvement in neutrophil extracellular traps. *Front Immunol*. 2012; 3: 424. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00424. PMID: 23346086.
10. *Zhang J., Shao Y., Wu J., Zhang J., Xiong X., Mao J.,Wei Y., et al.* Dysregulation of neutrophil in sepsis: recent insights and advances. *Cell Commun Signal*. 2025; 23 (1): 87. DOI: 10.1186/s12964-025-02098-y. PMID: 39953528.
11. *Sergunova V., Inozemtsev V., Vorobjeva N., Kozlova E., Sherstyukova E., Lyapunova S., Chernysh A.* Morphology of neutrophils during their activation and NETosis: atomic force microscopy study. *Cells*. 2023; 12 (17): 2199. DOI: 10.3390/cells12172199. PMID: 37681931.
12. *Dewitt S., Hallett M.* Leukocyte membrane «expansion»: a central mechanism for leukocyte extravasation. *J Leukoc Biol*. 2007; 81 (5): 1160–4. DOI: 10.1189/jlb.1106710. PMID: 17360954.
13. *Hallett M. B., Dewitt S.* Ironing out the wrinkles of neutrophil phagocytosis. *Trends Cell Biol*. 2007; 17 (5): 209–14. DOI: 10.1016/j.tcb.2007.03.002. PMID: 17350842.
14. *Гребенчиков О. А., Касаткина И. С., Каданцева К. К., Мешков М.А., Баева А. А.* Влияние лития хлорида на активацию нейтрофилов под действием сыворотки пациентов с септическим шоком. *Общая реаниматология*. 2020; 16 (5): 45–55. *Grebenchikov O. A., Kasatkina I. S., Kadantseva K. K., Meshkov M. A., Bayeva A. A.* The effect of lithium chloride on neutrophil activation on exposure to serum of patients with septic shock. *Gen Reanimatol = Obshchaya Reanimatologiya*. 2020; 16 (5): 45–55. (in Russ.&Eng.). DOI: 10.15360/1813-9779-2020-5-45-55.
15. *Образцов И. В., Годков М. А., Кулабухов В. В., Владимирова Г. А., Измайлов Д. Ю., Проскурнина Е. В.* Функциональная активность нейтрофилов при ожоговом сепсисе. *Общая реаниматология*. 2017; 13 (2): 40–51. *Obraztsov I. V., Godkov M. A., Kulabukhov V. V., Vladimirova G. A., Izmailov D. Y., Proskurnina E. V.* Functional activity of neutrophils in burn sepsis. *Gen Reanimatol = Obshchaya Reanimatologiya*. 2017; 13 (2): 40–51. (in Russ.&Eng.). DOI: 10.15360/1813-9779-2017-2-40-51.
16. *Starostin D. O., Kuzovlev A. N., Dolgikh V. T., Grebenchikov O. A., Polyakov P. A., Grechko A. V.* Influence of sevoflurane on neutrophils in patients with sepsis. *Russ J Anesthesiol Reanimatol*. (in Russ.&Eng.). 2024; (5): 50. DOI: 10.17116/anaesthesiology202405150.
17. *Liu S., Han Y., Kong L., Wang G., Ye Z.* Atomic force microscopy in disease-related studies: exploring tissue and cell mechanics. *Microsc Res Tech*. 2024; 87 (4): 660–684. DOI: 10.1002/jemt.24471. PMID: 38063315.
18. *Dumitru A. C., Koehler M.* Recent advances in the application of atomic force microscopy to structural biology. *J Struct Biol*. 2023; 215 (2): 107963. DOI: 10.1016/j.jsb.2023.107963. PMID: 37044358.
19. *Kerdegari S., Canepa P., Odino D., Oropesa-Nuñez R., Relini A., Cavalleri O., Canale C.* Insights in cell biomechanics through atomic force microscopy. *Materials (Basel)*. 2023; 16 (8): 2980. DOI: 10.3390/ma16082980. PMID: 37109816.
20. *Sokolov I., Iyer S., Woodworth C. D.* Recovery of elasticity of aged human epithelial cells *in vitro*. *Nanomedicine*. 2006; 2 (1): 31–36. DOI: 10.1016/j.nano.2005.12.002. PMID: 17292113.
21. *Pérez-Domínguez S., Kulkarni S. G., Rianna C., Radmacher M.* Atomic force microscopy for cell mechanics and diseases. *Neuroforum*. 2020; 26 (2): 101–109. DOI: 10.1515/nf-2020-0001.
22. *Makarova N., Kalaparthi V., Seluanov A., Gorbunova V., Dokukin M. E., Sokolov I.* Correlation of cell mechanics with the resistance to malignant transformation in naked mole rat fibroblasts. *Nanoscale*. 2022; 14 (39): 14594–14602. DOI: 10.1039/D2NR01633h. PMID: 36155714.
23. *Burn G. L., Foti A., Marsman G., Patel D. F, Zychlinsky A.* The Neutrophil. *Immunity*. 2021; 54 (7): 1377–1391. DOI: 10.1016/j.immuni.2021.06.006. PMID: 34260886.
24. *Tilley D. O., Abuabed U., Arndt U. Z., Schmid M., Florian S., Jungblut P. R., Brinkmann V., et al.* Histone H3 clipping is a novel signature of human neutrophil extracellular traps. *Elife*. 2022; 11: e68283. DOI: 10.7554/eLife.68283. PMID: 36282064.
25. *Thiam H. R., Wong S. L., Qiu R., Kittisopikul M., Vahabikashi A., Goldman A. E., Goldman R. D., et al.* NETosis proceeds by cytoskeleton and endomembrane disassembly and PAD4-mediated chromatin decondensation and nuclear envelope rupture. *Proc Natl Acad Sci*. 2020; 117 (13): 7326–7337. DOI: 10.1073/pnas.1909546117. PMID: 32170015.
26. *Inozemtsev V., Sergunova V., Vorobjeva N., Kozlova E., Sherstyukova E., Lyapunova S., Chernysh A.* Stages of NETosis Development upon Stimulation of Neutrophils with Activators of Different Types. *Int J Mol Sci*. 2023; 24 (15): 12355. DOI: 10.3390/ijms241512355. PMID: 37569729.
27. *Wei M., Zhang Y., Wang Y., Liu X., Li X., Zheng X.* Employing atomic force nicroscopy (AFM) for microscale investigation of interfaces and interactions in membrane fouling processes: new perspectives and prospects. *Membranes (Basel)*. 2024; 14 (2): 35. DOI: 10.3390/membranes14020035. PMID: 38392662.
28. *Миронов В. Л.* Основы сканирующей зондовой микроскопии. Нижний Новгород: Российская академия наук, Институт физики микроструктур; 2004: 110. *Mironov V. L.* Fundamentals of scanning probe microscopy. Nizhny Novgorod: Russian Academy of Sciences, Institute of Physics of Microstructures; 2004: 110. (in Russ.).
29. *Schneider C. A., Rasband W. S., Eliceiri K. W.* NIH Image to imageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012; 9 (7): 671–675. DOI: 10.1038/nmeth.2089. PMID: 22930834.
30. *Zhou Y., Xu Z., Liu Z.* Impact of neutrophil extracellular traps on thrombosis formation: new findings and future perspective. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022; 12: 910908. DOI: 10.3389/fcimb.2022.910908. PMID: 35711663.

Поступила 01.04.2025
Принята 27.05.2025
Принята в печать 09.06.2026