

ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ФАГОЦИТОЗА С МАРКЕРОМ АЦИДИФИКАЦИИ ФАГОСОМ pHrodo™ ПРИ ЗИМОЗАНОВОМ ПЕРИТОНИТЕ У КРЫС

© 2019 г. С. Ю. Шилов^{1,2*}, Ю. И. Шилов^{1,2}, Я. А. Туляев¹,
С. Ю. Барков²

*E-mail: stshilov@mail.ru

¹«Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия;

²ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е. А. Вагнера» Минздрава России, Пермь, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 28.03.2019

Исследовали изменение показателей фагоцитоза при 12-часовом зимозановом перитоните у крыс методом проточной лазерной цитометрии с использованием зимозана, меченого рН-сенситивным флуорохромом green pHrodo™ (Thermo Fisher Scientific). Выявлено увеличение абсолютных параметров фагоцитоза при исследовании клеток перитонеального экссудата, лейкоцитов крови и костного мозга у крыс с перитонитом в сравнении с интактными животными.

Ключевые слова: зимозановый перитонит, pHrodo™, ацидификация фагосом, перитонеальные фагоциты, лейкоциты крови, миелоциты

DOI: 10.31857/S102872210006497-1

Адрес: 614081, Пермский край, г. Пермь, ул. Голева, 13 «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН», Шилов Станислав Юрьевич.

Тел. +7(342) 2807442; факс (342) 2809211.

E-mail: stshilov@mail.ru

Авторы:

Шилов С. Ю., к.м.н., м.н.с., «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия;

Шилов Ю. И., к.м.н., доцент, в.н.с., «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия;

Туляев Я. А., аспирант, «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия;

Барков С. Ю., студент медико-профилактического факультета, ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е. А. Вагнера» Минздрава России, Пермь, Россия.

Для инструментального исследования фагоцитоза и созревания фагосом, сопровождающегося их ацидификацией (снижением рН до 4,0–4,5), на современном этапе используются рН-сенситивные флуоресцентные красители, которые флуоресцируют только при низких значениях рН внутри фагосом, но не светятся при физиологических уровнях рН вне кле-

ток [1, 2]. Наиболее часто используют грамнегативные и грампозитивные бактерии, частицы зимозана, меченые флуорохромами pHrodo™ green (Ex/Em 509/533 нм) и pHrodo™ red (Ex/Em 560/585 нм) [1, 2]. Исследование фагоцитоза с этими флуорохромами возможно методами конфокальной микроскопии, проточной лазерной цитометрии, а при кинетической оценке в режиме реального времени – с помощью современных планшетных флуориметров и планшетных инвертированных микроскопов с серийной съёмкой непосредственно в инкубаторе (Essen Biosciences IncuCyte FLR, IncuCyte Zoom, IncuCyte S3, NanoEnTek JuLI Stage) [2]. Ранее этот подход был адаптирован нами для проточного лазерного цитометра Guava EasyCyte (Millipore) [3].

Цель работы – исследование изменения показателей фагоцитоза с маркером ацидификации фагосом pHrodo™ при зимозановом перитоните у крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования выполнены на самцах белых неинбредных крыс в возрасте 3–6 месяцев.

Для индукции перитонита животным вводили стерильную суспензию зимозана А внутрибрюшинно в дозе 50 мг/кг массы тела. Животных выводили из эксперимента под наркозом. Перитонеальные фагоциты выделяли методом промывания брюшной полости 20 мл среды 199 с добавлением 20 ЕД/мл гепарина. Клетки костного мозга извлекали из бедренной кости методом промывания костномозговой полости 2 мл среды 199. Лейкоциты крови выделяли методом осаждения эритроцитов в 0,1% растворе метилцеллюлозы (Sigma-Aldrich, США). После двукратного отмывания центрифугированием и подсчёта абсолютного числа лейкоцитов в камере Нейбауэра (AC1000 Improved Neubauer, Hawksley, Великобритания) их концентрацию доводили до 25×10^6 клеток в 1 мл в полной питательной среде (ППС) следующего состава: среда RPMI-1640 без L-глутамин с добавлением 2 мМ GlutaMAX™, 1 мМ пирувата натрия, 1% заменимых аминокислот в MEM (все Gibco®, Life technologies™), 10 мМ HEPES (Sigma-Aldrich). В пробирках Эппендорф объёмом 0,2 мл смешивали 88 мкл ППС, 4 мкл суспензии лейкоцитов (25×10^6 клеток/мл) и 8 мкл преинкубированной для опсонизации при 37 °С в течение 30 мин смеси равных объемов частиц зимозана, меченого зеленым pHrodo™ (100×10^6 частиц/мл; pHrodo™ Green Zymosan Bioparticles™ Conjugate for Phagocytosis, Thermo Fisher Scientific, P35365) и аутоплазмы. Параллельно ставили пробы с неопсонизированными частицами (вместо аутоплазмы вносили ППС), а также негативные контрольные пробы без объектов фагоцитоза (аутофлуоресценция) и без лейкоцитов. Пробы инкубировали при 37 °С в течение 120 мин, после чего пробирки помещали на лед и их содержимое количественно переносили в плоскодонные 96-луночные планшеты (Медполимер, Россия), используя для отмывания и увеличения объема каждой пробы по 100 мкл охлажденного до 4 °С раствора Версена (Биолот, Россия) с рН, доведенной до 7,4. Анализ интенсивности флуоресценции проводили с помощью планшетного проточного лазерного цитометра Guava EasyCyte (Hayward, CA, США), который непосредственно позволяет оценить абсолютное количество клеток на микролитр без использования эталонных частиц благодаря использованию стандартизированного микрокапилляра и высокоточного микронасоса (The Lee Company, США). Далее данные анализировали в программе Guava CytoSoft 5.3, где в мо-

дулях Guava Express Plus и Guava Express PRO проводили последовательное гейтирование гистограмм, полученных с датчика переднего светорассеяния (Forward Scatter) по количеству флуоресцентных событий по датчику Green Fluorescence. При этом все отгейтированные клетки объективно отражают уровень ацидификации фагосом, так как при физиологических значениях рН вне клетки green pHrodo™ не флуоресцирует, и интенсивность флуоресценция прямо пропорциональна снижению рН до 4,0–4,5 при ацидификации фагосом. Результаты выражали в виде абсолютного числа флуоресцирующих событий на всю брюшную полость для перитонеальных клеток, на костный мозг одной бедренной кости для миелоцитов и на 1 мкл крови, которое отражает общее число клеток с ацидифицированными фагосомами. Статистический анализ проводили с помощью методов описательной статистики и *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что у крыс с 12-часовым зимозановым перитонитом фагоцитарная активность перитонеальных фагоцитов с опсонизированным и неопсонизированным зимозаном статистически значимо выше, чем у интактных самцов крыс. Аналогичные изменения (статистически значимая активация фагоцитоза) отмечаются и при исследовании фагоцитарной активности лейкоцитов крови и клеток костного мозга, что указывает на системный характер активации фагоцитирующих клеток. В связи с тем, что длительность контакта фагоцитов с объектами фагоцитоза *in vitro* в наших экспериментах составляет 120 мин (именно это время требуется для созревания и ацидификации фагосом), статистически значимые различия показателей абсолютного числа светящихся событий в пробах с опсонизированным зимозаном в сравнении с неопсонизированным отсутствуют. С учетом того, что по данным микроскопического анализа, максимальный уровень поглощения зимозана (плато) достигается уже через 30 мин, при инкубации в течение 120 мин фактор влияния лиганд-рецепторной адгезии объектов фагоцитоза к мембране фагоцита становится несущественным. Число светящихся событий в этих условиях отражает количество клеток с фагосомами, подвергшимися ацидификации.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-44-590995 и Администрации Пермского края, а также в рамках государствен-

ного задания «ИЭГМ УрО РАН», номер госрегистрации темы: 01201353248.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Zhang R., Kobayashi Y., Kazumura K., Tsuchiya H., Morishita N., Inagawa H., Soma G. Development of an evaluation device for phagocytic activity of new phagocytes using simple and pH-sensitive particles that do not require pre-treatment. *Anticancer Res.* 2016, 36(7), 3613–3618.
2. Kapellos T.S., Taylor L., Lee H., Cowley S.A., James W.S., Iqbal A.J., Greaves D.R. A novel real time imaging platform to quantify macrophage phagocytosis. *Biochemical Pharmacology* 2016, 116, 107–119.
3. Шилов Ю. И., Шилов С. Ю., Жукова А. Е., Барков С. Ю., Петухова А. А. Изменение уровня ацидификации фагосом у крыс в зависимости от фазы эстрального цикла. *Российский иммунологический журнал* 2016, том 10 (19), № 2 (1), 183–184. [Shilov Ju. I., Shilov S. Ju., Zhukova A. E., Barkov S. Ju., Petuhova A. A. Changes in level of phagosomal acidification in rats depending on the phase of the estrous cycle. *Rus. J. Immunol.* 2016, Vol. 10(19), issue 2(1), 183–184.]

CHANGES IN PHAGOCYTOSIS PARAMETERS WITH A MARKER OF PHAGOSOME ACIDIFICATION pHrodo™ UNDER-ZYMOSAN-INDUCED PERITONITIS IN RATS

© 2019 S. Ju. Shilov^{1,2*}, Ju. I. Shilov^{1,2}, Ya. A. Tulyaev¹, S. Yu. Barkov²

*E-mail: stshilov@mail.ru

¹*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences* – a branch of the PFRC UB RAS, Perm, Russia;

²*Acad. E. A. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russia*

Received: 15.03.2019. Accepted: 28.03.2019

The changes in phagocytosis under 12-hour zymosan-induced peritonitis in rats were investigated using flow laser cytometry using zymosan labeled with pH-sensitive flurochrome green pHrodo™ (Thermo Fisher Scientific). An increase in the absolute parameters of phagocytosis was found in the study of peritoneal exudate cells, blood leukocytes and bone marrow cells in rats with peritonitis in comparison with intact animals.

Key words: zymosan-induced peritonitis, pHrodo™, acyidification of phagosomes, pertoneal phagocytes, blood leukocytes, myelocytes

Authors:

Shilov S. Ju., ✉ PhD, MD, Junior Researcher, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the UB of the RAS, Perm, Russia. E-mail: stshilov@mail.ru;

Shilov Ju. I., PhD, MD, Associate Professor, Leading Researcher, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the UB of the RAS, Perm, Russia;

Tulyaev Ya. A., Aspirant, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the UB of the RAS, Perm, Russia;

Barkov S. Yu., Student, Acad. E. A. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russia.