

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ФАГОЦИТОЗА В ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ДВОЙНОГО ОКРАШИВАНИЯ И ВИЗУАЛИЗАЦИИ

© 2024 Е.В. Лысакова¹, А.Н. Шумеев², С.А. Чувпило¹, В.С. Лактюшкин²,
Н.А. Арсентьева³, М.Ю. Бобров¹, С.А. Рыбцов^{2*}

¹ Научно-технологический университет «Сириус»,
Научный центр генетики и наук о жизни, направление «Иммунобиология и биомедицина»,
354340 Сириус, Краснодарский край, Россия

² Научно-технологический университет «Сириус»,
Ресурсный центр клеточных технологий и иммунологии, Лабораторный комплекс,
354340 Сириус, Краснодарский край, Россия; электронная почта: rybtsov.sa@talantiuspeh.ru

³ Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера,
197101 Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 03.11.2023

После доработки 09.01.2024

Принята к публикации 19.02.2024

Фагоцитоз – важнейшая функция врождённого иммунитета человека и животных. Снижение способности к фагоцитозу связано со многими заболеваниями и старением иммунной системы. Определение фагоцитарной динамики клеток требует количественной оценки бактерий внутри и снаружи фагоцита. Хотя проточная цитометрия является наиболее распространённым методом оценки фагоцитоза, её использование не предполагает визуализации и прямой количественной оценки пространственной локализации бактерий. В данном исследовании применяли методы проточной цитометрии (сортировки) и конфокальной микроскопии в сочетании с «двухцветной» маркировкой бактерий *Escherichia coli*, которые использовали как объект фагоцитоза. Для обеспечения высокой производительности количественного и пространственного распознавания двухцветных *E. coli*, ассоциированных с фагоцитами, также применяли проточную цитометрию с визуализацией в потоке. На основании полученных данных было сделано предположение о важной роли удержания патогенов на поверхности миелоидных и лимфоидных клеток без последующей интернализации. Разработанный метод бактериальной конъюгации существенно повысил точность количественной и пространственной оценки фагоцитоза и может быть рекомендован в качестве вспомогательного подхода при использовании проточных цитометров с визуализацией для анализа фагоцитоза в цельной крови.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фагоцитоз, *E. coli*, проточная цитометрия, конфокальная микроскопия, Amnis, лейкоциты человека.

DOI: 10.31857/S0320972524050126 EDN: YNTLXM

ВВЕДЕНИЕ

Фагоцитоз широко представлен среди животных, начиная от простейших и заканчивая многоклеточными организмами. Фагоцитирующие клетки млекопитающих – моноциты и макро-

фаги, нейтрофилы, дендритные клетки – представители врождённого иммунитета, первая линия защиты против разнообразных патогенов, попадающих в организм из окружающей среды и способных вызвать инфекцию. Фагоцитоз также обеспечивает элиминацию апоптотических клеток.

Принятые сокращения: AF405 – флуорохром Alexa Fluor 405; Dim – клетки, интенсивность которых не более чем на декаду выше, чем у DN; DN – двойная негативная популяция: клетки, интенсивность флуоресценции которых находится на уровне автофлуоресценции неокрашенных клеток; DP – двойная позитивная популяция по FITC и AF405; FITC – флуорохром флуоресцеин-5-изотиоцианат; Mid – клетки с умеренной интенсивностью флуоресценции (в пределах декады выше, чем у Dim); PBS – фосфатный буферный солевой раствор.

* Адресат для корреспонденции.

Таким образом, фагоцитоз является необходимым процессом поддержания гомеостаза у многоклеточных животных [1]. Снижение способности клеток к фагоцитозу связано с рядом заболеваний, в том числе с иммунодефицитными состояниями при инфекционных заболеваниях. Например, снижение фагоцитарной активности обнаруживается при пародонтозе [2], синдроме бактериальной колонизации нижних дыхательных путей [3] и других состояниях, приводящих к опасным патологиям [4, 5].

При вторжении в организм чужеродного агента «профессиональные» фагоциты распознают его молекулярные паттерны разнообразными толл-подобными рецепторами (TLRs, toll-like receptors), находящимися на поверхности фагоцитов. TLRs распознают, например, компоненты клеточной стенки бактерий, а Fc-рецепторы распознают антигена, опсонизирующие патогены [6]. Инициация воспаления через альтернативные механизмы также в первую очередь активирует фагоцитоз. Фагоцитоз – незаменимый, базовый механизм, способствующий элиминации патогена или подавлению его распространения. Именно поэтому многие инфекции эволюционно отобрали пути блокировки фагоцитоза как основные механизмы защиты от иммунитета хозяина [7, 8]. Блокировка фагоцитоза является также одним из основных механизмов ухода опухолей от иммунного распознавания и удаления [9].

Фагоцитоз является важным звеном между врождённым и адаптивным иммунитетом: фагоцитоз патогенов может оканчиваться представлением коротких пептидных последовательностей чужеродного микроорганизма после процессинга антигенов на поверхности фагоцитов в контексте комплекса гистосовместимости класса II (МНС II), что инициирует пролиферацию Т-лимфоцитов, запуская адаптивный иммунный ответ [10].

Оценка фагоцитарной активности – исключительно важная диагностическая методика, позволяющая предупреждать патологии иммунитета, исследовать механизмы развития опасных заболеваний, а также тестировать лекарственные препараты на модуляцию фагоцитоза. Оценка фагоцитарной активности лейкоцитов стандартно проводят с помощью специальных фагоцитарных тестов [11, 12]. Существует множество вариаций этого анализа с использованием различных объектов для фагоцитоза, одним из которых является кишечная палочка *Escherichia coli*. В состав клеточной стенки этих бактерий входит липополисахарид (ЛПС), который распознаётся TLR4 на поверхности фагоцита. Фагоцитарная активность может быть оценена как у суспензионной фракции клеток крови, так и у адгезивной (на пластике или клеточном матриксе), при этом адгезия не явля-

ется необходимым условием для осуществления фагоцитоза нейтрофилами [13].

Фагоцитарная активность лейкоцитов у людей с возрастом снижается [14]. Снижение фагоцитарной активности рассматривают вкуче с другими изменениями, такими как уменьшение количества наивных Т- и В-клеток, повышение продукции противовоспалительных цитокинов, снижение секреции специфических антител. Возрастное снижение фагоцитоза сопровождается смещением пропорции «миелоидные клетки : лимфоидные клетки» в сторону миелоидных клеток, к которым в том числе относятся и фагоциты. Все эти изменения связывают с так называемым «старением иммунной системы» [15]. Стимуляция миелопоэза с возрастом, по-видимому, является адаптацией организма к потере фагоцитарной функции, и поэтому для точной оценки возрастных изменений необходима разработка количественных методов анализа фагоцитоза на уровне отдельных клеток.

Важным количественным параметром фагоцитоза является фагоцитарное число – количество бактерий, интернализованных одним фагоцитом за время проведения эксперимента. Являясь интегральным показателем, он, однако, не учитывает пространственное положение бактерии относительно клеточной мембраны фагоцита, теряя таким образом сведения о кинетике интернализации и завышая показатели фагоцитоза. Для рутинной оценки фагоцитарного числа необходимы высокопроизводительные методы, обеспечивающие подсчёт адгезированных на поверхности и интернализованных, т.е. фагоцитированных бактерий, что позволит более точно оценивать фагоцитарную активность и учитывать кинетику процесса.

Применяемая для оценки фагоцитарного числа микроскопия времязатратна и значительно подвержена влиянию человеческого фактора, что накладывает ограничение как на производительность метода, воспроизводимость, так и статистическую достоверность результатов. Проточная цитометрия – высокопроизводительный и один из наиболее простых и доступных методов оценки данных фагоцитарного теста, однако его применение не подразумевает визуализацию данных, что затрудняет количественный анализ пространственного положения бактерий в клетке. В настоящей работе представлена разработанная методика, позволяющая оценить фагоцитарное число с одновременной количественной оценкой адгезированных на поверхности и интернализованных фагоцитами бактерий (на примере *E. coli*) с использованием проточной цитометрии.

Разработанный в этом исследовании метод подразумевает использование фиксированных (убитых) бактерий *E. coli*, конъюгированных с флуорохромом FITC (флуоресцеин-5-изотиоцианат)

и биотином. После инкубации этих бактерий с образцом периферической крови человека оставшиеся снаружи (адгезированные) бактерии выявляются дополнительной окраской стрептавидином, конъюгированным с флуорохромом AF405 (Alexa Fluor 405). Стрептавидин специфично связывается с биотином на бактериях, не проникая внутрь фагоцитов благодаря целостности их мембраны. Интернализированные бактерии флуоресцируют в канале FITC, но не AF405, тогда как адгезированные на поверхности бактерии флуоресцируют в обоих каналах. Следовательно, сопоставление вариантов мечения позволяет определить местоположение каждой бактерии (внутри или на поверхности фагоцита). На проточном цитометре флуоресцентный сигнал оценивается интегрально для каждой клетки. По интенсивности флуоресценции можно выделить несколько субпопуляций фагоцитов, что на начальном этапе исследования позволило предположить наличие фагоцитов с разным числом бактерий в разных субпопуляциях.

Мы совместили данные, полученные с помощью проточной цитометрии и сортировки клеток, с данными конфокальной микроскопии для количественной оценки фагоцитированных бактерий, валидируя таким образом использование проточной цитометрии в рутинных исследованиях без визуализации.

Помимо количественного анализа с помощью трудоёмкого совмещения сортировки методом проточной цитометрии и количественной визуальной оценки конфокальной микроскопией, образцы были протестированы с помощью проточного цитометра с визуализацией Amnis Flowsight. Данный цитометр позволяет получать фотографии каждой частицы в потоке и с высокой скоростью анализировать пространственное расположение бактерий в клетке. Разработанный в данном исследовании метод фагоцитоза с двойным окрашиванием бактерий значительно повышает точность анализа на современных проточных цитометрах с визуализацией.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Приготовление бактерий, конъюгированных с FITC и биотином. В 20 мл ночной культуры *E. coli* штамма *DH5a*, выращенной из отдельной колонии в среде LB, добавляли стерильный глицерин до концентрации 10% и замораживали при -20°C в аликвотах по 50 мкл. За день до эксперимента 50 мкл маточной суспензии *E. coli* в 10%-ном глицерине помещали в 10 мл среды LB и наращивали в течение ночи. Оптическую плотность суспензии определяли на спектрофотометре Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer («Thermo

Fisher Scientific», США) по абсорбции на 540 нм. Разводили средой LB до оптической плотности 0,6, что по заранее отработанной калибровочной кривой соответствовало концентрации $1,29 \times 10^{10}$ бактерий в миллилитре. Далее 500 мкл этой суспензии центрифугировали 1 мин при 2350 g. Осадок ресуспендировали в 250 мкл фиксатора (10%-ный нейтральный забуференный формалин, ООО «Компания Элемент», Россия, предварительно разбавленный в 2 раза фосфатным буферным солевым раствором (PBS)) и инкубировали 30 мин при комнатной температуре на ротационном перемешивателе (10 об./мин). Отмывку от фиксатора проводили в трёх сменах по 500 мкл PBS, осаждая центрифугированием 2 мин при 2350 g. После последнего центрифугирования осадок ресуспендировали в 250 мкл PBS, добавляли 250 мкл боратного буфера (50 мМ, pH 9,0) и метили FAM изотиоцианатом (FITC) («Lumiprobe», Россия) согласно инструкции производителя. Для этого сухой FITC растворяли в концентрации 20 мг/мл в диметилсульфоксиде, аликвотировали по 10 мкл и хранили при -80°C . К 500 мкл суспензии бактерий добавляли 1 мкл приготовленного раствора FITC и немедленно интенсивно перемешивали на вортексе, далее инкубировали 16 часов в темноте при 37°C при постоянном перемешивании в термошейкере Biosan TS-100 («BioSan», Латвия) при 400 об./мин. По окончании инкубации бактерии отмывали в трёх сменах по 500 мкл PBS, осаждая центрифугированием 2 мин при 2350 g. После последнего центрифугирования осадок ресуспендировали в 200 мкл PBS и хранили при 4°C не более 24 часов до использования. Эффективность конъюгации оценивали на проточном цитометре BD LSRFortessa («BD», США) по интенсивности флуоресценции в канале FITC (лазер 488 нм, фильтр 530/20 нм) в сравнении с контрольными неконъюгированными фиксированными образцами. Далее, бактерии конъюгировали биотином, используя коммерческий набор FluoReporter Mini-biotin-XX Protein Labeling Kit («Thermo Fisher Scientific», кат. № F6347) согласно инструкции производителя. Для этого к 200 мкл бактериальной суспензии добавляли 20 мкл свежеприготовленного 1 М раствора бикарбоната натрия в воде (pH 8,3–8,5) и затем добавляли 20 мкл раствора активного эфира биотина (Компонент А) в деионизированной воде (200 мкл воды на одну пробирку с сухим Компонентом А, раствор готовили непосредственно перед использованием, т.к. реактивная форма биотина быстро гидролизует в воде). Бактерии инкубировали с активным эфиром биотина 2 часа в темноте при комнатной температуре и постоянном перемешивании в термошейкере Biosan TS-100 (400 об./мин), после чего дважды отмывали в PBS центрифугированием 2 мин при 2350 g, ресуспендировали в 200 мкл PBS

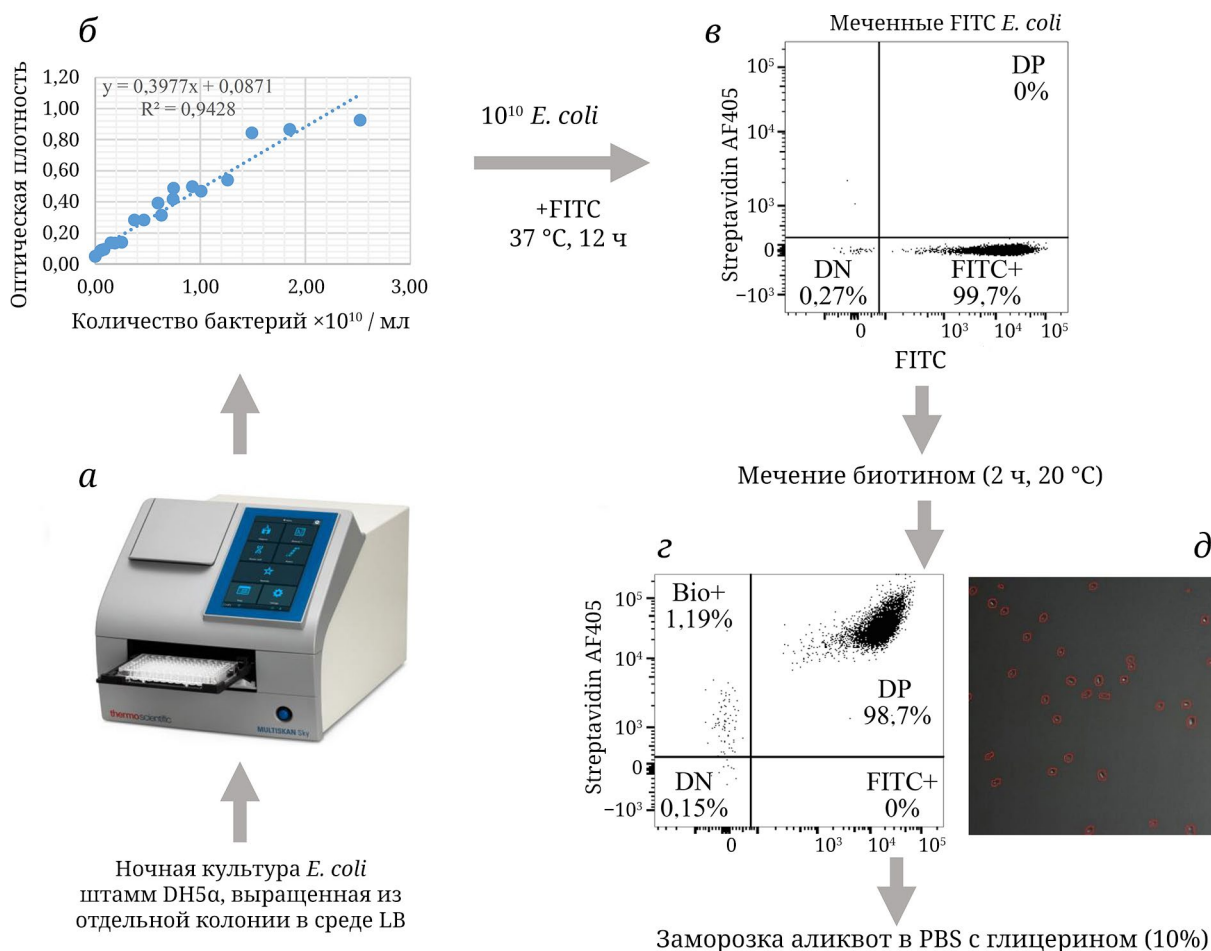


Рис. 1. Схема флуоресцентного мечения бактерий. *E. coli* конъюгировали FITC, а затем биотином для того, чтобы различать бактерии внутри и снаружи фагоцитирующих клеток. Показана последовательность проведения конъюгаций и контроль качества препарата *E. coli*. Рассчитывали концентрацию бактерий по оптической плотности (а) по заранее построенной калибровочной кривой (б). После конъюгации *E. coli* с FITC проводили контрольную проточную цитометрию (в) для проверки однородности конъюгации (FITC+ 99,7%). После дальнейшей конъюгации *E. coli* с биотином проверяли однородность мечения в каналах AF405 и FITC – гомогенность конъюгации составила 98,7% (DP) для двух меток (г). Перед замораживанием маточной суспензии готовых бактерий подсчитывали их концентрацию по DIC и флуоресценции в заданном объеме, рассчитанном на основе известных параметров глубины фокуса и размера поля зрения (д)

и добавляли стерильный глицерин до концентрации 10%. Определяли концентрацию подсчетом в камере Горяева, доводили PBS до концентрации 10^{10} бактерий на 1 мл, аликвотировали по 20 мкл, замораживали и хранили при -20°C . Все работы проводили в стерильных условиях.

Для проверки эффективности конъюгации биотином к аликвоте *E. coli* (разбавленной в 300 мкл до концентрации 1×10^7 бактерий *E. coli*/мл) добавляли 1 мкл стрептавида, конъюгированного с AF405 («Invitrogen», США, кат. № S32351), инкубировали 30 мин на льду, отмывали в 1,2 мл PBS, центрифугировали 2 мин при 2350 g, ресуспендировали в 200 мкл PBS и анализировали на проточном цитометре BD LSRFortessa, оценивая двойную позитивную популяцию в каналах FITC и AF405 (лазер 405 нм, фильтр 450/50 нм). Схема описанной методики представлена на рис. 1.

Для приготовления растворов использовали деионизированную воду с проводимостью 18 МОм, полученную с помощью системы очистки воды Millipore Milli-Q IQ 7000 («Merck», Германия).

Фагоцитарный тест. Периферическую кровь отбирали с помощью системы для вакуумного взятия крови из вены условно здоровых добровольцев в пробирки с гепарином натрия («Химмедснаб», Россия) в Медпункте Университета «Сириус» квалифицированным персоналом.

Концентрацию лейкоцитов в образце определяли на гематологическом анализаторе MEK-7300K («Nihon Kohden», Япония). Эту информацию использовали далее для расчёта количества добавляемых бактерий, исходя из соотношения лейкоциты : бактерии = 1 : 20 в соответствии с опубликованными ранее исследованиями [16]. Для проведения теста отбирали 100 мкл цельной крови в полипропилен-

новую неадгезионную пробирку («Eppendorf», Германия, кат. № 0030125150), стабилизировали температуру в CO₂-инкубаторе (37 °C, 5% CO₂) 5 мин. Фагоцитарный тест проводили в суспензионной фракции клеток цельной крови без применения специальных процедур для адгезии к поверхности [13]. К 100 мкл крови добавляли суспензии бактерий из расчёта 20 бактерий на один лейкоцит, инкубировали 1 ч при 37 °C в CO₂-инкубаторе. Для остановки фагоцитоза образцы помещали на лёд (см. Приложение, рис. П1) [17].

Проточная цитометрия и сортировка клеток.

К аликвоте крови на льду после проведения фагоцитоза добавляли антитела CD45 APC-eFluor 780 (клон HI30, «eBioscience», США, кат. № 47-0459-42; 1 : 100) для маркирования лейкоцитов, а также стрептавидин, конъюгированный с AF405 («Invitrogen», кат. № S32351; 1 : 100), для выявления бактерий на поверхности клеток. Образцы инкубировали 30 мин в темноте на льду, отмывали добавлением 1,4 мл PBS с последующим центрифугированием в течение 5 мин при 330 g; супернатант удаляли и ресуспендировали осторожным пипетированием в 100 мкл PBS, после чего добавляли в образцы 900 мкл 1-кратного лизирующего буфера с фиксирующим агентом BD FACS Lysing Solution («BD», кат. № 349202) и инкубировали 10 мин в темноте при комнатной температуре. Далее, образцы центрифугировали 5 мин при 330 g, осадок ресуспендировали в 200 мкл PBS и до анализа хранили при 4 °C. Схема описанной методики представлена на рис. П1 Приложения.

Настройка компенсации проводилась в автоматическом режиме в программном обеспечении соответствующего проточного цитометра или сортера по одноцветным контролям, приготовленным в соответствии с описанной выше методикой. Исключение составил контроль для AF405, который готовился путём окрашивания аликвоты крови антителами CD33 biotin (клон AC104.3E3, «Miltenyi», США, кат. № 130-113-347) в течение 30 мин на льду с последующим выявлением биотина стрептавидином, конъюгированным с AF405, и дальнейшей обработкой, как описано выше.

Предварительный анализ образцов проводили на проточном цитометре BD LSRFortessa. Для количественного анализа клеток *E. coli* и их пространственного расположения в лейкоцитах после проведения фагоцитоза клетки сортировали на клеточном сортере, а отсортированные фракции анализировали на конфокальном микроскопе. Сортировку проводили на сортере Sony SH800, оснащённом 4 лазерами (405, 488, 561 и 638 нм), со 100-мкм ноззлами у сортировочных чипов. Стратегия гейтирования подразумевала последовательное выделение единичных клеток по параметрам импульса Area и Height для прямого

светорассеяния (FSC), затем по тем же параметрам импульса для бокового светорассеяния (SSC), очистку от явного мусора по параметрам светорассеяния, выделение CD45⁺ популяции, определение субпопуляций фагоцитировавших лейкоцитов по интенсивности флуоресценции в каналах FITC и AF405 (Приложение, рис. П2). Клетки сортировали в 5-мл полистироловые пробирки с 1 мл PBS, отбирая не менее 10 000 клеток для каждой субпопуляции лейкоцитов.

Для высокопроизводительного анализа пространственного расположения и количества бактерий в фагоцитах методом визуализирующей проточной цитометрии применяли проточный цитометр Amnis FlowSight («Cytex», США), оснащённый 3 лазерами (405, 488 и 642 нм). Работа была выполнена с использованием оборудования ЦКП «Цитометрии и биомаркеры» ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера в Санкт-Петербурге.

Конфокальная микроскопия. После сортировки клетки концентрировали центрифугированием 5 мин при 330 g, ресуспендировали в 10 мкл PBS и помещали на заряженное предметное стекло (Polysine Adhesion Slides, «Thermo Fisher Scientific») во влажной камере на 30 мин при комнатной температуре, после чего накрывали покровным стеклом и анализировали на конфокальном микроскопе. Конфокальные флуоресцентные изображения были получены с помощью инвертированного лазерного сканирующего конфокального микроскопа (ZEISS LSM 980 Airyscan, «Carl Zeiss AG», Германия) через объектив с 20-кратным увеличением (Plan-Apochromat 20×, числовая апертура 0,8). Изображения в 4 каналах были получены последовательным сканированием двух треков: канал APC-eFluor 780 в первом треке и каналы AF405, FITC и DIC – во втором. APC-eFluor 780 возбуждался 639 нм лазером (максимальная мощность – 20 мВт, пропускание акустооптического фильтра (AOTF) – 2,6%), детекция в диапазоне от 647 до 757 нм (тип детектора – GaAsP, усиление – 713 В). AF405 возбуждался 405 нм лазером (максимальная мощность – 20 мВт, пропускание AOTF – 0,2%), детекция в диапазоне от 410 до 484 нм (тип детектора – GaAsP, усиление – 650 В). FITC возбуждался 488 нм лазером (максимальная мощность – 13 мВт, пропускание AOTF – 0,04%), детекция осуществлялась в диапазоне от 519 до 628 нм (тип детектора – Multialkali-PMT, усиление – 845 В); DIC – дифференциально-интерференционный контраст в проходящем свете, полученный с помощью лазеров второго трека, т.е. 405 и 488 нм, и детектора в проходящем свете T-PMT, детекция осуществлялась в диапазоне от 300 до 900 нм (тип детектора – Multialkali-PMT, усиление – 368 В). Были установлены следующие параметры сканирования: увеличение сканирования – 8×,

размер изображения – 429 × 429 пикселей, время пикселя (время накопления сигнала) – 4,91 микросекунда; размер пикселя – $dx = dy = 0,124$ мкм. Изображения были получены с использованием программного обеспечения ZEN (версия ZEN Blue 3.2, «Carl Zeiss AG»).

Программное обеспечение. Обработку результатов проводили в Microsoft Excel 2019; анализ данных проточной цитометрии – в BD FlowJo v. 10.9.0; анализ данных Amnis FlowSight – в программе Amnis IDEAS 6.2; анализ данных конфокальной микроскопии – в ImageJ/Fiji v. 1.54f [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Количественный анализ фагоцитоза методом сортировки и микроскопии клеток. При анализе лейкоцитов ($CD45^+$) на проточном цитометре после проведённого фагоцитоза выделяли не-

сколько субпопуляций по гранулярности, размеру и флуоресценции *E. coli* (рис. 2). Для анализа распределения числа фагоцитированных или адгезированных на поверхности бактерий в популяциях гранулоцитов, моноцитов и лимфоцитов провели сортировку выделенных популяций на сортере Sony SH800 (стратегия гейтирования представлена на рис. 2 и рис. П2 Приложения). Отсортированные клетки анализировали на конфокальном микроскопе ZEISS LSM 980 Airyscan. После отработки протокола сортировку клеток проводили 3 раза, используя образцы крови трёх доноров.

Результат сопоставления данных сортировки и микроскопии представлен на рис. 3. Наиболее многочисленной при сортировке оказалась двойная негативная (DN) субпопуляция – 71,2 % от всех $CD45^+$ клеток. Из 74 проанализированных конфокальной микроскопией сортированных клеток в DN-популяции от трёх доноров не найдено ни одной клетки, содержащей *E. coli* внутри

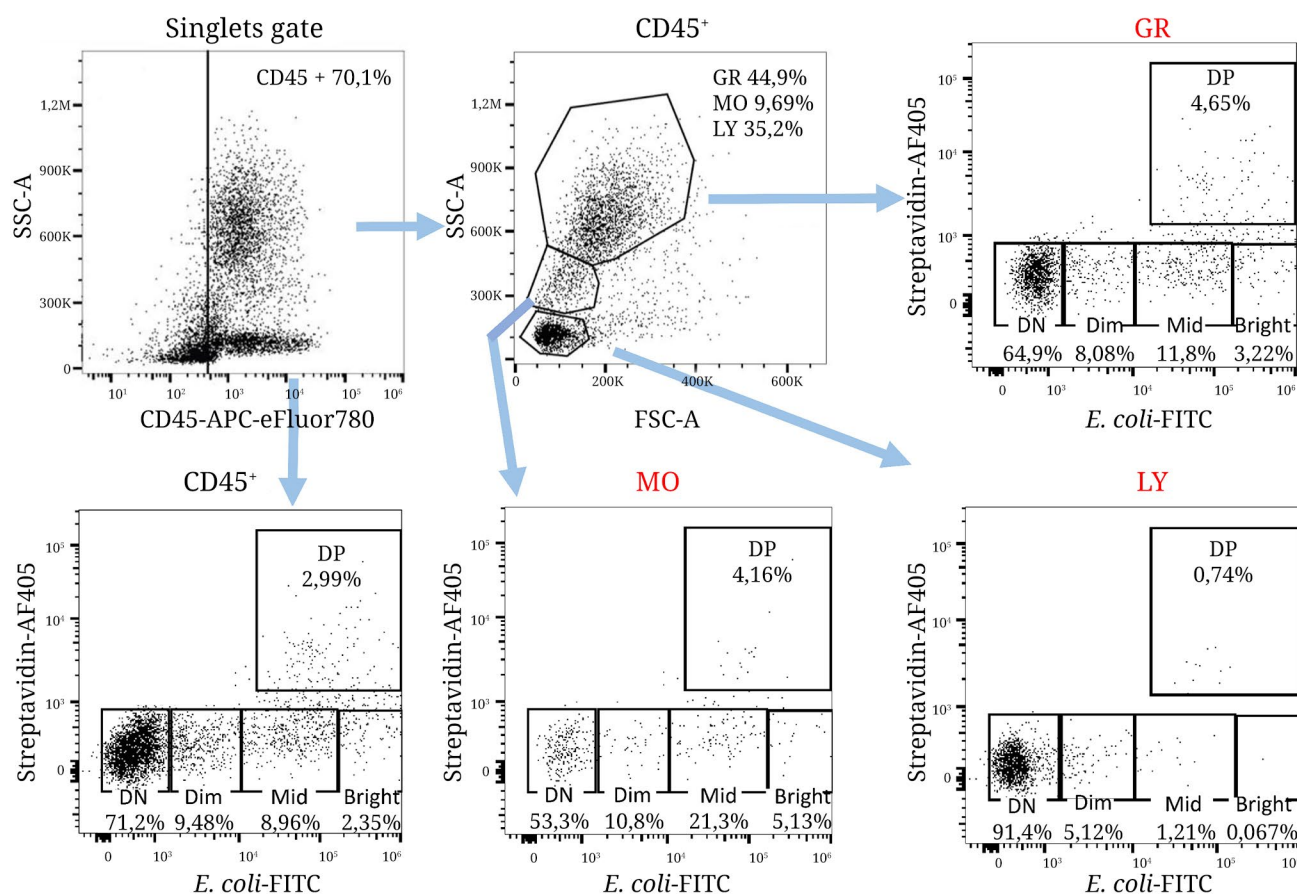


Рис. 2. Стратегия анализа и гейтирования для сортера Sony SH800: из единичных клеток (Singlets gate) выделяли лейкоциты ($CD45^+$), далее эту популяцию сортировали по интенсивности флуоресценции и локализации бактерий (*E. coli*) на следующие категории: DN – двойная негативная популяция (нефагоцитировавшие клетки); Dim – клетки, флуоресценция которых не более чем на декаду выше, чем DN; Mid – клетки с умеренной интенсивностью флуоресценции (больше на декаду, чем у Dim); Bright – клетки с самой высокой интенсивностью флуоресценции; DP – двойная по FITC и AF405 позитивная популяция бактерий на поверхности (нижняя панель слева). Для анализа по субпопуляциям клетки гейтировали по гранулярности (SSC) и размеру (FSC) на гранулоциты (GR), моноциты (MO) и лимфоциты (LY). Расширенная информация по стратегии гейтирования приведена на рис. П2 Приложения

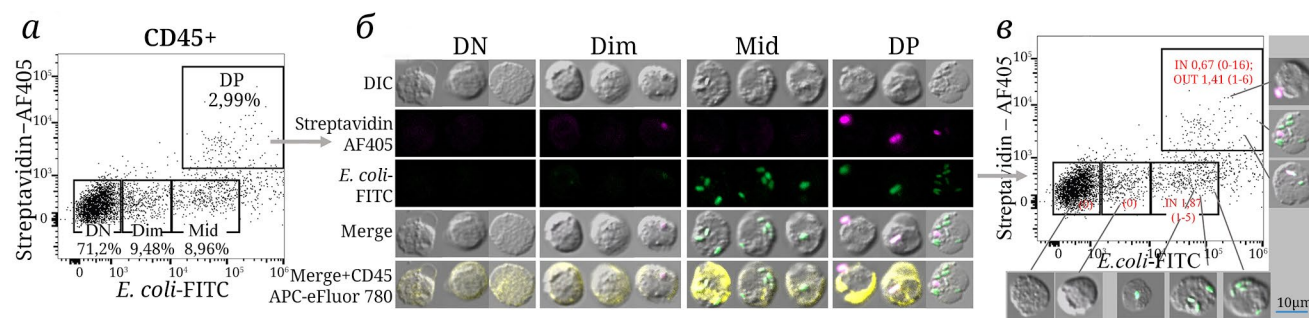


Рис. 3. Схема эксперимента по сортировке фагоцитирующих популяций лейкоцитов ($CD45^+$) и анализа отсортированных фракций на конфокальном микроскопе. Отсортированные популяции (а) были проанализированы с использованием конфокальной микроскопии (б), где DN – двойная негативная популяция (0 бактерий); Dim – клетки, интенсивность флуоресценции которых не более чем на декаду больше, чем у DN (автофлуоресценция – 0 бактерий); Mid – клетки с умеренной интенсивностью флуоресценции, в пределах декады выше, чем у Dim (1–5 бактерий внутри клетки); DP – популяция, двойная позитивная по FITC и AF405 (гетерогенная – бактерии внутри и/или на поверхности клетки). Наложение флуоресцентных изображений (FITC, AF405) и DIC обозначено как Merge (в). Красными цифрами на графике справа указаны средние значения количества *E. coli* внутри (IN) и снаружи (OUT) лейкоцитов, в скобках показан разброс данных. Индивидуальные изображения клеток – примеры клеток с различным количеством *E. coli* в популяциях (б, в). Число независимых экспериментов $n = 3$

или на поверхности. Популяция Dim демонстрировала тусклую флуоресценцию в канале FITC (в пределах 1 декады ярче клеток популяции DN). Из 33 проанализированных на микроскопе клеток Dim-популяции найдена только одна клетка с бактерией, в то время как в остальных наблюдали лишь повышенную флуоресценцию цитоплазмы. Вероятно, это фоновая автофлуоресценция, возникающая в результате поглощения бактериальных остатков, конъюгированных с FITC. Популяция Mid образует выраженный кластер по флуоресценции FITC при анализе методом проточной цитометрии, отстоящий примерно на одну декаду по яркости от Dim-популяции; по интенсивности флуоресценции в канале AF405 клетки Mid соответствуют автофлуоресценции клеток DN. Это свидетельствует о том, что данная популяция состоит из фагоцитировавших бактерии клеток, не содержащих *E. coli* на поверхности.

Визуальный анализ с помощью конфокальной микроскопии (проанализирована 151 клетка) подтверждает это предположение. Фагоцитарное число в популяции Mid варьируется от 1 до 5 (среднее значение – 1,87 бактерий на клетку, рис. 3). DP – двойная позитивная популяция по интенсивности флуоресценции в каналах AF405 и FITC – составляет 3% и представляет собой лейкоциты с бактериями либо только на поверхности, либо и на поверхности, и внутри клеток. Среднее число бактерий внутри клеток популяции DP (по данным микроскопического анализа 51 клетки) составляет 0,67 бактерий на клетку (от 0 до 16, рис. 3); среднее число бактерий снаружи клеток – 1,41 (от 1 до 6, рис. 3). Таким образом, данная популяция является крайне гетерогенной и может быть в дальнейшем разделена на несколько субпопуляций.

Визуализация фагоцитов в потоке с использованием двойного окрашивания выявила присутствие значительного количества *E. coli* на поверхности клеток. Хотя последовательное применение сортировки и конфокальной микроскопии позволяет оценить количество и пространственное расположение бактерий в фагоцитах, всё же такой анализ остаётся трудоёмким и затратным по времени. Применение только проточной цитометрии позволяет по флуоресценции различить количество *E. coli*, находящихся внутри фагоцитов, но не даёт возможности количественно оценить фагоцитоз, когда бактерии находятся одновременно и внутри, и снаружи.

Для увеличения производительности при количественном анализе фагоцитоза клеточных популяций, имеющих бактерии как внутри, так и на поверхности, а также для получения статистически более точных показателей фагоцитарного числа был использован визуализирующий проточный цитометр Amnis FlowSight. Этот прибор позволяет фотографировать клетки в потоке со скоростью до нескольких тысяч в секунду и анализировать пространственное положение микробных частиц в фагоцитах. На рис. 4 показаны стратегия гейтирования и суммарное представление данных с визуализацией (нижний ряд, левый рисунок), а также панель полученных на этом цитометре снимков клеток. Фотографии клеток разделены по каналам флуоресценции (каналы: FITC, которым окрашены все бактерии, BF и BF 2 – образы клеток в светлом поле, AF405 обозначает бактерии на поверхности клеток и наложение каналов (Merge)). Анализ изображений клеток позволяет заключить, что двойное окрашивание демонстрирует не интернализованные фагоцитом бактерии,

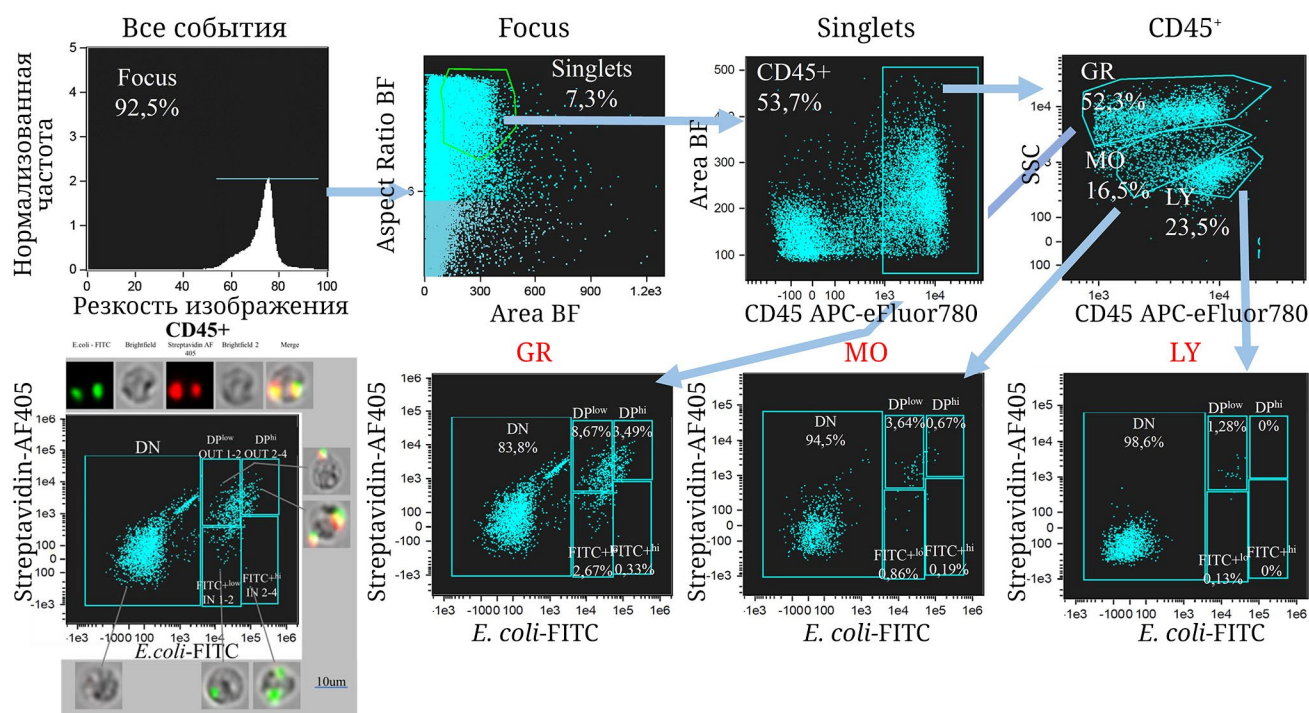


Рис. 4. Стратегия гейтирования для проточного цитометра с визуализацией Amnis FlowSight и обобщённое представление результатов визуализации. Цифрами обозначены процент клеток в популяции и количество бактерий внутри (IN) и снаружи (OUT) клеток. Для отдельных популяций было проанализировано до 352 клеток (рис. ПЗ Приложения). Число независимых экспериментов $n = 3$

а только находящиеся на его поверхности, в то время как интернализированные бактерии детектируются только в канале FITC. По интенсивности сигнала флуоресценции возможно разделить 4 популяции клеток, различающихся количеством *E. coli* внутри и снаружи клеток. Так, в популяции DP^{low} клетки содержат по 1–2 бактерии на своей поверхности, в популяции DP^{hi} – 2–4 бактерии на поверхности, в популяции $FITC^{low}$ внутри фагоцитировавших клеток содержится по 1–2 бактерии, в популяции $FITC^{hi}$ – по 2–4 бактерии внутри фагоцитов.

Наряду с двойным окрашиванием была проверена эффективность работы встроенной в приложение IDEAS 6.2 программы, определяющей на основе сделанных цитометром снимков местоположение бактерий внутри или снаружи клетки. В случае детектирования программой бактерий на поверхности клеток, а не внутри, данные программы и двойного окрашивания совпадают на 94,9% (рис. 5, а, гейт Outside stain). Это свидетельствует о том, что распознанные программой (камерой) бактерии на поверхности клеток действительно позитивны как по FITC, так и по стрептавидину. Поскольку программа производит оценку на основании параметров клетки по изображению в одной проекции, в 70% случаев те бактерии, которые, согласно данным программы, были распознаны как находящиеся внутри клеток, фактически, согласно данным по двойному окрашиванию, находились на их поверхности (рис. 5, б). Это связано с техни-

ческим ограничением визуализирующих возможностей Amnis FlowSight. На рис. 5, в представлены результаты фагоцитоза лимфоцитов. 98,6% клеток являются двойными негативными по FITC и AF405. По результатам двойного окрашивания показано, что 1,28% лимфоцитов способны удерживать *E. coli* на поверхности без дальнейшего фагоцитоза – по крайней мере в течение часа инкубации с цельной кровью.

Во многих исследованиях для анализа фагоцитоза используются различные объекты. В частности, широко распространено использование в исследованиях *E. coli*, меченных pH-зависимыми красителями. Однако использование этих реагентов требует замены плазмы крови на специальный буфер для контроля pH, что отрицательно влияет на жизнеспособность клеток и приводит к искажению результатов [19]. Более того, при изучении фагоцитоза *in vivo* в цельной крови сложно контролировать pH плазмы, в связи с чем использование бактерий, меченных pH-зависимыми красителями, ограничено и не позволяет различать локализацию кишечной палочки и внутри, и снаружи. Одноцветное мечение без возможности различить бактерии внутри и снаружи клеток приводит к неточным результатам [19, 20]. В то же время использование специфических к антигенам отдельных видов бактерий антител [21] не является универсальным и требует применения новых видоспецифичных антител при изучении

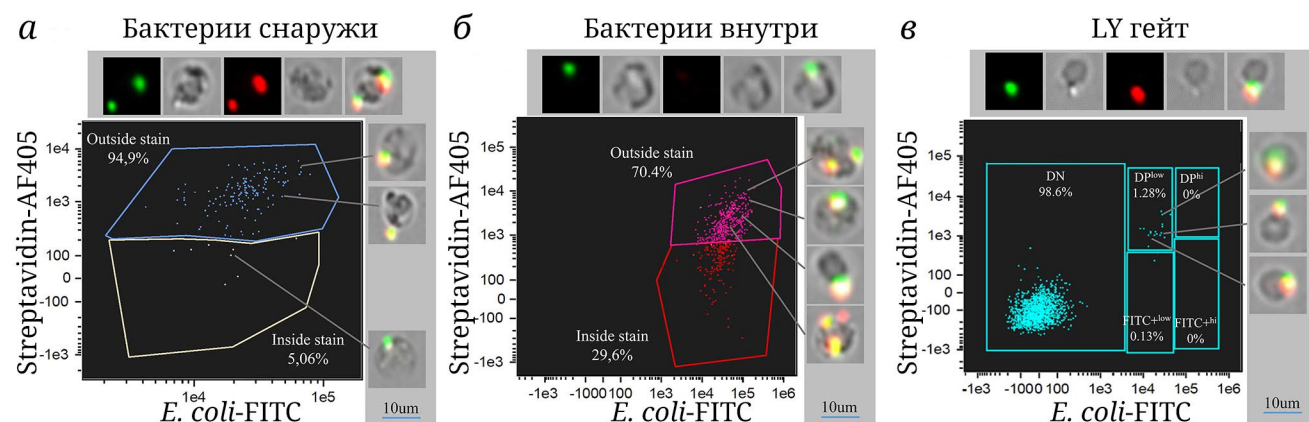


Рис. 5. Локализация бактерий относительно клеток по результатам анализа встроенной программы Amnis и двойного окрашивания. *а* – Бактерии, которые детектировались программой как находящиеся снаружи клеток. 94,9% этих клеток действительно были позитивны и по FITC, и по AF405, то есть бактерии адгезированы на поверхности фагоцитов. *б* – Бактерии, которые детектировались программой как находящиеся внутри клеток. Однако 70,4% из этих клеток были позитивны и по FITC, и по AF405, что, согласно двойному окрашиванию, указывает на локализацию бактерий на поверхности клеток. *в* – Лимфоцитарный (LY) гейт. Хотя программа детектирует некоторые клетки в популяции лимфоцитов как фагоцитирующие, все 1,28% клеток, согласно двойному окрашиванию, находились на поверхности. Верхние панели иллюстрируют (слева направо) каналы: FITC (*E. coli*), Brightfield 1, AF405 (biotin-streptavidin, *E. coli*), Brightfield 2 и наложение всех каналов. Правые панели визуализируют клетки, показанные в виде точек на графиках проточной цитометрии. Синей линией дана масштабная линейка для изображений клеток. Образцы поклеточного анализа изображений показаны на рис. ПЗ Приложения

фагоцитоза разных объектов. Использование меченных FITC и биотином бактерий любого вида позволяет легко идентифицировать нефагоцитированные бактерии путём поверхностного окрашивания конъюгированным с AF405 стрептавидином и облегчает их обнаружение с помощью конфокальной микроскопии. Однако, несмотря на высокую точность, использование конфокальной микроскопии не позволяет анализировать большое количество объектов с высокой производительностью. С появлением новых методов проточной цитометрии с визуализацией стала возможной обработка больших массивов изображений с высокой производительностью. В настоящем исследовании мы применили проточную цитометрию с визуализацией, а также разработали препарат *E. coli*, позволяющий проводить анализ быстро и с высокой точностью. Таким образом, с помощью дополнительного окрашивания возможно детектировать бактерии внутри и снаружи клеток в любой момент фагоцитоза в цельной крови, определяя кинетику данного процесса.

В ходе исследования выявлено, что программа определяет, какие бактерии находятся внутри, а какие на поверхности клеток (на основании полученных с помощью цитометра Amnis FlowSight снимков), с низкой точностью: некоторые лимфоциты детектировались программой как фагоцитировавшие, однако результаты двойного окрашивания опровергли эти данные (рис. 5, в). Таким образом, алгоритмы распознавания визуализирующих проточных цитометров при исполь-

зовании традиционных объектов для фагоцитоза потенциально приводят к переоценке фагоцитоза, в то время как разработанные в ходе исследования методы конъюгации *E. coli* и проведения фагоцитарного теста могут существенно увеличить точность результатов и быть использованы для оценки количественной и временной динамики поглощения патогенов.

Для описанного метода существуют ограничения, которые, однако, легко преодолимы. Известно, что некоторые виды бактерий содержат в своей клеточной стенке авидины, которые характеризуются высокой аффинностью к биотину [22]. В случае использования таких бактерий вместо конъюгирования с биотином возможна детекция биотином, конъюгированным с различными флуорохромами. В случае, если авидинов для детекции недостаточно, возможно конъюгирование бактерий с избытком реактивного эфира биотина и последующее окрашивание стрептавидином или предварительное блокирование эпитопов авидина биотином и дальнейшее мечение реактивным эфиром биотина по аминок группам белков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе представлены результаты количественного анализа фагоцитоза с применением сортировки и последующей визуализацией анализируемых популяций. С применением методов сортировки клеток и конфокальной микро-

скопии данные по количеству и расположению *E. coli* относительно фагоцитирующих популяций клеток крови сопоставлены со значениями флуоресценции. Обнаружено, что за один час фагоцитоза большинство гранулоцитов и моноцитов завершает цикл интернализации внутрь клетки. Однако при избытке добавляемых бактерий они адгезируются без интернализации на поверхности около 20% из взаимодействующих с ними фагоцитов. Мы предполагаем, что удержание бактерий на поверхности лимфоцитами может являться важной составляющей противомикробной иммунной функции наряду с фагоцитозом.

Количественный анализ фагоцитарного числа минорных популяций клеток, имеющих бактерии как снаружи, так и внутри, обычно требует применения трудозатратной конфокальной микроскопии с 3D реконструкцией для определения местоположения бактерий относительно фагоцита. Использование цитометрии с визуализацией совместно с препаратом *E. coli* с двойным мечением позволяет с большой пропускной способностью и высокой точностью количественно определять наличие бактерий внутри и снаружи клеток. Двойное окрашивание *E. coli* позволило значительно улучшить точность результатов на проточных цитометрах с визуализацией клеток в потоке.

Кроме того, было показано, что некоторые субпопуляции лимфоцитов способны удерживать бактерии, однако, не интернализуя их за время эксперимента.

Дальнейший анализ быстро фагоцитирующих и удерживающих бактерии на поверхности субпопуляций с использованием цитометрии с визуализацией позволит более точно понимать функцию отдельных клеточных популяций в процессах врождённого иммунитета.

Вклад авторов. Е.В. Лысакова, А.Н. Шумеев, С.А. Чувпило, В.С. Лактешкин, Н.А. Арсентьева – проведение экспериментов; Е.В. Лысакова, Н.А. Арсентьева, А.Н. Шумеев, С.А. Рыбцов – обсуждение результатов исследования; Е.В. Лысакова, Н.А. Арсентьева, А.Н. Шумеев, М.Ю. Бобров, В.С. Лактешкин – обсчёт и анализ результатов исследований;

Е.В. Лысакова, С.А. Рыбцов – написание текста; Е.В. Лысакова, А.Н. Шумеев, С.А. Чувпило, В.С. Лактешкин, Н.А. Арсентьева, М.Ю. Бобров, С.А. Рыбцов – редактирование текста статьи; С.А. Рыбцов – концепция и руководство работой.

Благодарности. Благодарим С.А. Недоспасова, О.К. Бацунова и В.В. Зарубаева за содействие в выполнении работы; Лабораторный комплекс Университета «Сириус» и Ресурсный центр клеточной технологии и иммунологии за предоставление оборудования для работы; ЦКП ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера «Цитометрии и биомаркеры» за помощь и предоставление проточного цитометра с визуализацией Amnis FlowSight («Cytex»).

Финансирование. Работа по анализу фагоцитоза с использованием проточной цитометрии и конфокальной микроскопии, а также анализ результатов и подготовка рукописи были выполнены Лысаковой Е.В., Шумеевым А.Н. и Рыбцовым С.А. при поддержке Российского научного фонда, проект № 23-15-00443 (<https://rscf.ru/project/23-15-00443/>). Приготовление бактерий, конъюгированных с двойной меткой, количественный анализ, а также валидация препарата на Amnis FlowSight были выполнены Лысаковой Е.В., Чувпило С.А., Бобровым М.Ю. при финансировании Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-10-2021-093; проект НИР-ИМБ-2102).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют национальным этическим стандартам, Хельсинкской декларации 1964 года и её последующим изменениям и одобрены комитетом по биоэтике Университета «Сириус» (протокол от 06.03.2023 г.). Информированное добровольное согласие получено от всех индивидуальных участников исследования до отбора образцов крови.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lancaster, C. E., Ho, C. Y., Hipolito, V. E., Botelho, R. J., and Terebiznik, M. R. (2019) Phagocytosis: what's on the menu? *Biochem. Cell Biol.*, **97**, 21-29, <https://doi.org/10.1139/bcb-2018-0008>.
2. Carneiro, V. M. A., Bezerra, A. C. B., Guimarães, M. D. C. M., and Muniz-Junqueira, M. I. (2012) Decreased phagocytic function in neutrophils and monocytes from peripheral blood in periodontal disease, *J. Appl. Oral Sci.*, **20**, 503-509, <https://doi.org/10.1590/s1678-77572012000500002>.
3. Singh, R., Belchamber, K. B. R., Fenwick, P. S., Chana, K., Donaldson, G., Wedzicha, J. A., Barnes, P. J., Donnelly, L. E., and COPDMap consortium (2021) Defective monocyte-derived macrophage phagocytosis is associated with exacerbation frequency in COPD, *Respirat. Res.*, **22**, 1-11, <https://doi.org/10.1186/s12931-021-01718-8>.

4. Nakahashi-Oda, C., Fujiyama, S., Nakazawa, Y., Kanemaru, K., Wang, Y., Lyu, W., Shichita, T., Kitaura, J., and Shibuya, A. (2021) CD300a blockade enhances efferocytosis by infiltrating myeloid cells and ameliorates neuronal deficit after ischemic stroke, *Sci. Immunol.*, **6**, eabe7915, <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abe7915>.
5. Kelley, S. M., and Ravichandran, K. S. (2021) Putting the brakes on phagocytosis: “don’t-eat-me” signaling in physiology and disease, *EMBO Rep.*, **22**, e52564, <https://doi.org/10.15252/embr.202152564>.
6. Tang, Z., Davidson, D., Li, R., Zhong, M. C., Qian, J., Chen, J., and Veillette, A. (2021) Inflammatory macrophages exploit unconventional pro-phagocytic integrins for phagocytosis and anti-tumor immunity, *Cell Rep.*, **37**, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110111>.
7. Uribe-Querol, E., Rosales, C. (2017) Control of phagocytosis by microbial pathogens, *Front. Immunol.*, **8**, 1368, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01368>.
8. Gagnon, E., Duclos, S., Rondeau, C., Chevet, E., Cameron, P. H., Steele-Mortimer, O., Paiement, J., Bergeron, J. J. M., and Desjardins, M. (2002) Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages, *Cell*, **110**, 119-131, [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00797-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00797-3).
9. Dempsey, L. A. (2019) Inhibiting phagocytosis, *Nat. Immunol.*, **20.9**, 1089-1089, <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0485-z>.
10. Cruz, F. M., Chan, A., and Rock, K. L. (2023) Pathways of MHC I cross-presentation of exogenous antigens, *Semin. Immunol.*, **66**, 101729, <https://doi.org/10.1016/j.smim.2023.101729>.
11. Porpodis, K., Domvri, K., Zarogoulidis, P., Petridis, D., Tsirgogianni, K., Papaioannou, A., Hatzizisi, O., Kioumis, I., Liaka, A., Kikidaki, V., Lampaki, S., Organtzis, J., and Zarogoulidis, K. (2015) Roflumilast, a phosphodiesterase-4 inhibitor, induces phagocytic activity in Greek COPD patients, *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.*, **10**, 1123-1128, <https://doi.org/10.2147/COPD.S83205>.
12. Morais, T. C., Honorio-França, A. C., Fujimori, M., de Quental, O. B., Pessoa, R. S., França, E. L., and de Abreu, L. C. (2019) Melatonin action on the activity of phagocytes from the colostrum of obese women, *Medicina*, **55**, 625, <https://doi.org/10.3390/medicina55100625>.
13. Garcia-Seyda, N., Seveau, V., Manca, F., Biarnes-Pelicot, M., Valignat, M. P., Bajenoff, M., and Theodoly, O. (2021) Human neutrophils swim and phagocytise bacteria, *Biol. Cell*, **113**, 28-38, <https://doi.org/10.1111/boc.202000084>.
14. Li, W. (2013) Phagocyte dysfunction, tissue aging and degeneration, *Ageing Res. Rev.*, **12**, 1005-1012, <https://doi.org/10.1016/j.arr.2013.05.006>.
15. Ciabattini, A., Nardini, C., Santoro, F., Garagnani, P., Franceschi, C., and Medaglini, D. (2018) Vaccination in the elderly: the challenge of immune changes with aging, *Semin. Immunol.*, **40**, 83-94, <https://doi.org/10.1016/j.smim.2018.10.010>.
16. Robinson, J. P., Carter, W. O., and Narayanan, P. (1997) Functional assays by flow cytometry, in *Manual of Clinical Laboratory Immunology. Volume Immune Cell Phenotyping and Flow Cytometric Analysis: Am. Soc. Microbiol.* (Rose, Ed., Folds, J. D., Lane, H. C., and Nakamura, R., eds) 5, pp. 245-254.
17. Serrander, L., Skarman, P., Rasmussen, B., Witke, W., Lew, D. P., Krause, K. H., Stendahl, O., and Nüße, O. (2000) Selective inhibition of IgG-mediated phagocytosis in gelsolin-deficient murine neutrophils, *J. Immunol.*, **165**, 2451-2457, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.5.2451>.
18. Lindner, B., Burkard, T., and Schuler, M. (2020) Phagocytosis assays with different pH-sensitive fluorescent particles and various readouts, *Biotechniques*, **68**, 245-250, <https://doi.org/10.2144/btn-2020-0003>.
19. Yang, F., Zhang, F., Yang, L., Li, H., and Zhou, Y. (2021) Establishment of the reference intervals of whole blood neutrophil phagocytosis by flow cytometry, *J. Clin. Lab. Analysis*, **35**, e23884, <https://doi.org/10.1002/jcla.23884>.
20. Jackaman, C., Tomay, F., Duong, L., Razak, N. B. A., Pixley, F. J., Metharom, P., and Nelson, D. J. (2017) Aging and cancer: the role of macrophages and neutrophils, *Ageing Res. Rev.*, **36**, 105-116, <https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.03.008>.
21. DeLoid, G. M., Sulahian, T. H., Imrich, A., and Kobzik, L. (2009) Heterogeneity in macrophage phagocytosis of *Staphylococcus aureus* strains: high-throughput scanning cytometry-based analysis, *PLoS One*, **4**, e6209, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006209>.
22. Laitinen, O. H., Kuusela, T. P., Kukkurainen, S., Nurminen, A., Sinkkonen, A., and Hytönen, V. P. (2021) Bacterial aviridins are a widely distributed protein family in Actinobacteria, Proteobacteria and Bacteroidetes, *BMC Ecol. Evol.*, **21**, 1-14, <https://doi.org/10.1186/s12862-021-01784-y>.

QUANTITATIVE ANALYSIS OF PHAGOCYTOSIS IN WHOLE BLOOD USING DOUBLE STAINING AND VISUALIZATION

E. V. Lysakova¹, A. N. Shumeev², S. A. Chuvpilo¹, V. S. Laktyushkin², N. A. Arsentieva³,
M. Yu. Bobrov¹, and S. A. Rybtsov^{2*}

¹ Division Immunobiology and Biomedicine, Center for Genetics and Life Sciences,
Sirius University of Science and Technology, 354340 Sirius, Krasnodar Region, Russia

² Resource Center for Cell Technologies and Immunology, Sirius University of Science and Technology,
354340 Sirius, Krasnodar Region, Russia

³ Saint-Petersburg Pasteur Institute, 197101 St. Petersburg, Russia

Phagocytosis is an essential innate immunity function in humans and animals. A decrease in the ability to phagocytize is associated with many diseases and aging of the immune system. Assessment of phagocytosis dynamics requires quantification of bacteria inside and outside the phagocyte. Although flow cytometry is the most common method for assessing phagocytosis, it does not include visualization and direct quantification of location of bacteria. Here, we used double-labeled *Escherichia coli* cells to evaluate phagocytosis by flow cytometry (cell sorting) and confocal microscopy, as well as employed image cytometry to provide high-throughput quantitative and spatial recognition of the double-labeled *E. coli* associated with the phagocytes. Retention of pathogens on the surface of myeloid and lymphoid cells without their internalization was suggested to be an auxiliary function of innate immunity in the fight against infections. The developed method of bacterial labeling significantly increased the accuracy of spatial and quantitative measurement of phagocytosis in whole blood and can be recommended as a tool for phagocytosis assessment by imaging flow cytometry.

Keywords: phagocytosis, *E. coli*, flow cytometry, confocal microscopy, Amnis, human leukocytes