

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 571.27

NADPH-оксидаза модулирует Ca^{2+} -зависимое образование нейтрофильных внеклеточных ловушек**Н.В. Воробьева^{1,*}, Б.В. Черняк²**

¹Кафедра иммунологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

²Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119992, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40

*e-mail: nvvorobjeva@mail.ru

Хроническая гранулематозная болезнь (ХГБ) представляет собой тяжелый наследственный иммунодефицит, при котором пациенты страдают от рецидивирующих бактериальных и грибковых инфекций, а также aberrантных воспалительных процессов. Фенотип ХГБ обусловлен дефицитом фагоцитарной NADPH-оксидазы, приводящим к неспособности фагоцитов образовывать активные формы кислорода (АФК). Такие фагоциты ограничены в возможности осуществлять фагоцитоз, дегрануляцию, а также образование нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET) в ответ на многие рецепторные и фармакологические стимулы. Однако образование ловушек нейтрофилами пациентов с ХГБ в ответ на кальциевые ионофоры было описано нами в предыдущей работе. В ряде работ было показано, что дефицитные по NADPH-оксидазе нейтрофилы не только не могут генерировать АФК, но и благодаря отсутствию электрогенной функции фермента и деполяризации мембраны при активации имеют существенные нарушения притока внеклеточного Ca^{2+} и, как следствие, множественные отклонения в синтезе провоспалительных цитокинов. В настоящей работе мы показали, что образование нейтрофильных ловушек дефицитными по NADPH-оксидазе нейтрофилами в ответ на кальциевый ионофор A23187 сопровождается избыточным накоплением внутриклеточного Ca^{2+} . Такое нарушение мы объясняем отсутствием электрогенной функции мутантной NADPH-оксидазы, которая в норме вызывает деполяризацию плазматической мембраны. Результаты указывают на важную функцию фагоцитарной NADPH-оксидазы как модулятора транспорта внеклеточного Ca^{2+} и могут быть использованы для поиска средств борьбы с таким заболеванием, как ХГБ.

Ключевые слова: нейтрофилы человека, окислительный взрыв, активные формы кислорода, нейтрофильные внеклеточные ловушки, NETоз, хроническая гранулематозная болезнь

Хроническая гранулематозная болезнь (ХГБ) представляет собой наследственный иммунодефицит, при котором фагоциты не образуют супероксид-анион-радикалы (O_2^-) и их производные [1]. Невозможность генерировать супероксид-анион-радикалы связана с дефицитом многокомпонентного ферментного комплекса NADPH-оксидазы [2], что обусловлено мутациями генов, кодирующих его субъединицы (p47phox, p67phox, p40phox, gp91phox, p22phox и ГТФаза Rac2). Пациенты с ХГБ страдают от рецидивирующих бактериальных и грибковых инфекций, а также aberrантных воспалительных процессов. В связи с этим понимание сигнальных путей, ведущих к развитию фенотипа ХГБ, является важной задачей для поиска средств борьбы с этим недугом.

Ранее было показано, что стимуляция нейтрофилов рецепторными стимулами сопровождается повышением концентрации внутриклеточного Ca^{2+} , играющего важную роль в активации ряда

эффекторных функций, например, дегрануляции и окислительного взрыва [3]. Наиболее хорошо изученным механизмом, связанным с повышением концентрации Ca^{2+} , является образование инозитол-1,4,5-трифосфата, который, в свою очередь, активирует выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо (эндоплазматический ретикулум) [4]. Истощение Ca^{2+} в хранилищах клетки приводит к активации сенсорных белков STIM1 и STIM2 (stromal interaction molecule) и последующей стимуляции Ca^{2+} -активируемых каналов (CRAC, calcium release activated Ca^{2+} channel), расположенных в цитоплазматической мембране [5]. Активация CRAC-каналов способствует притоку Ca^{2+} внутрь клетки из внеклеточного пространства. После активации нейтрофила хемоаттрактантом *N*-формил-метионин-лейцин-фенилаланином (fMLP), а также активатором протеинкиназы С форбол-12-миристал-13-ацетатом (ФМА) происходит подавление входа внеклеточного Ca^{2+} . Таким образом, суммар-

ное поступление Ca^{2+} в клетку обеспечивается действием двух конкурирующих механизмов: стимулирующего и ингибирующего.

Учитывая, что функция NADPH-оксидазы в нейтрофилах здоровых доноров заключается в переносе одного электрона с NADPH на молекулярный кислород, в 80-е гг. было высказано предположение, что подавление притока внеклеточного Ca^{2+} при активации связано с электрогенной функцией фермента, приводящей к деполяризации мембраны. Эта гипотеза была доказана в экспериментах на нейтрофилах человека, показавших корреляцию между деполяризацией мембраны и подавлением входа внеклеточного Ca^{2+} в клетки [6]. Было установлено, что у нейтрофилов, выделенных из крови пациентов с ХГБ и имеющих дефицитную NADPH-оксидазу, такое подавление отсутствует, а накопление Ca^{2+} в эндоплазматическом ретикулуме происходит значительно быстрее, чем у нейтрофилов здоровых доноров [7].

Будучи «профессиональными» фагоцитами, нейтрофилы обеспечивают «первую линию» защиты от патогенов в очаге воспаления, осуществляя фагоцитоз, дегрануляцию и образование активных форм кислорода (АФК). В 2004 г. в лаборатории А. Циклински [8] был описан новый защитный механизм нейтрофилов, который заключается в высвобождении из клеток конденсированного хроматина, «декорированного» белками гранул, ядра и цитоплазмы. Такие структуры были названы нейтрофильными внеклеточными ловушками, или NET (Neutrophil Extracellular Traps), поскольку их главная функция состоит в ограничении распространения патогенов из первичного очага воспаления [8]. Следует отметить, что образование NET, как правило, сопровождается гибелью клетки, в связи с чем этот процесс был назван НЕТозом [9].

НЕТоз представляет собой многоступенчатый последовательно развивающийся процесс, при котором происходит образование АФК с участием NADPH-оксидазы и транслокация ферментов азурофильных гранул нейтрофильной эластазы (НЭ) и миелопероксидазы (МПО) в ядро [10]. В ядре, совместно с пептидил-аргинин-деаминазой 4 (PAD4), цитруллинирующей гистоны, НЭ и МПО осуществляют деконденсацию хроматина, что приводит к его последующему выбросу за пределы клетки – НЕТозу [11]. Было показано, что при активации НЕТоза также происходит повышение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} [12], и в настоящее время известны две ключевые Ca^{2+} -чувствительные мишени этого процесса: протеинкиназа С, ответственная за фосфорилирование субъединиц NADPH-оксидазы, и PAD4.

В ряде работ было установлено, что нейтрофилы пациентов с ХГБ, помимо невозможности генерировать АФК, также неспособны образовывать NET в ответ на многие рецепторные и фарма-

кологические стимулы (ФМА) [13, 14]. Вместе с тем, дефицитные по NADPH-оксидазе нейтрофилы все же образуют NET в ответ на кальциевые ионофоры иономицин и A23187 при участии митохондриальных АФК (мтАФК) [14, 15].

Мы предположили, что дефицитные по NADPH-оксидазе нейтрофилы не только не способны к генерации оксидаза-зависимых АФК, но и, благодаря отсутствию деполяризации мембраны при активации [7] и избыточному поступлению Ca^{2+} в клетки, имеют более глубокие нарушения агонист-индуцированных сигнальных путей. В соответствии с нашей гипотезой, нейтрофилы, выделенные из крови здоровых доноров и пациентов с ХГБ, стимулированные к НЕТозу кальциевым ионофором A23187, должны по-разному отвечать на истощение внутриклеточного Ca^{2+} , что и было проверено в нашей работе.

Материалы и методы

Реагенты. ФМА, A23187, fMLP, ВАРТА-АМ (1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetrakis(acetoxymethyl ester), люминол (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione) были закуплены в Sigma-Aldrich (США); SYBR Green, смола ProLong Gold – в Thermo Fisher Scientific (США).

Выделение первичных нейтрофилов человека.

Образцы крови пациентов с хронической гранулематозной болезнью были получены в процессе их планового обследования в Отделении клинической иммунологии и ревматологии Российской детской клинической больницы ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России. Образцы крови доноров были получены с их добровольного согласия в отделении переливания крови Российской детской клинической больницы. Исследования проводили согласно Хельсинкской декларации Всемирной Медицинской Ассоциации об этических принципах проведения медицинских исследований 2000 г. и протокола Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г. Исследования были одобрены локальным комитетом по этике Российской детской клинической больницы ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России.

Нейтрофилы выделяли из периферической крови с помощью центрифугирования в одноступенчатом градиенте плотности Ficoll-Нураque (плотность $1,077 \text{ г/см}^3$) в течение 25 мин при 400g и комнатной температуре, как описано ранее [16]. Основную массу эритроцитов удаляли путем седиментации в декстране. Оставшиеся эритроциты лизировали в гипотоническом растворе NaCl (0,2%) в течение 30 с и далее восстанавливали физиологический солевой состав путем добавления гипертонического NaCl (1,6%). Нейтрофилы ресуспендировали в полной культуральной среде

(ПКС), включающей RPMI 1640 с добавлением 10 мМ НЕРЕС, 2 мМ L-глутамин и 1% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). Полученные клетки были представлены на 98% гранулоцитами, а их жизнеспособность составляла более 99%, что определяли по исключению 0,1%-ного трипанового синего. Нейтрофилы инкубировали в течение 1 ч при 4°C перед экспериментом.

Оценка люминол-зависимой хемилюминесценции (ХЛ). Люминол-зависимую ХЛ использовали для оценки концентрации суммарных АФК (внутри- и внеклеточных) как описано ранее [17]. Свежевыделенные нейтрофилы в концентрации $2,5 \cdot 10^6$ кл./мл ($4,5 \cdot 10^5$ клеток) инкубировали с ВАРТА-АМ в возрастающих концентрациях в течение 20 мин в условиях 37°C и 5% CO_2 в ПКС (5% ЭТС). Далее ПКС заменяли на фосфатный буфер Кребса-Рингера (120 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1,7 мМ KH_2PO_4 , 8,3 мМ Na_2HPO_4 , 10 мМ глюкоза, 1 мМ $CaCl_2$, 1,5 мМ $MgCl_2$, pH 7,3). К $2 \cdot 10^5$ клеток добавляли люминол (80 мкМ, конечная концентрация) и проводили стимуляцию окислительного взрыва 2,5 мкМ A23187, 30 нМ ФМА или 800 нМ fMLP. Люминол-зависимую ХЛ анализировали сразу после стимуляции в течение 30 мин при 37°C в планшетном хемилюминометре Lucy 1 («Anthos Labtec», Австрия). Оценивали площадь, занимаемую кривыми ХЛ, и выражали степень окислительного взрыва в процентах от контроля (контроль: стимулированные нейтрофилы; 100%) в виде гистограмм.

Индукция и флуоресцентное окрашивание NET. Для обнаружения NET использовали флуоресцентную микроскопию. Для этого свежевыделенные нейтрофилы ($2 \cdot 10^5$ кл./мл) адгезировали на круглых покровных стеклах, находящихся в 24-луночном планшете в 500 мкл ПКС (1% ЭТС), в течение 30 мин при 37°C. Нейтрофилы инкубировали в лунках с ВАРТА-АМ в течение 20 мин при 37°C и 5% CO_2 . Образование NET индуцировали 30 нМ ФМА или 2,5 мкМ A23187 в течение 2 ч 40 мин и 4 ч соответственно. После стимуляции НЕТоза клетки фиксировали в растворе 4%-ного параформальдегида в течение 15 мин. Препараты погружали в SYBR Green, разведенный в фосфатно-солевом буфере в соотношении 1:10000 в соответствии с рекомендацией производителя, и окрашивали в течение 6 мин при комнатной температуре в темноте. Препараты погружали в смолу ProLong Gold и анализировали клетки с использованием флуоресцентного микроскопа Leica DM LB (Leica Microsystems, Германия). Фотографирование проводили с помощью камеры Leica DC300F.

Подсчитывали общее число клеток и число нетотических клеток в каждом поле зрения, и далее оценивали процент НЕТоза в нескольких полях зрения. Для каждого варианта стимуляции

было поставлено не менее 3 экспериментов, а для каждой концентрации ингибитора анализировали не менее 500 нейтрофилов.

Статистическая обработка. Статистическую обработку данных проводили с использованием одномерного дисперсионного анализа (ANOVA), сопровождаемого тестом множественного сравнения Бонферрони для оценки различий между группами. Данные выражали в виде среднего \pm ошибка среднего. Статистически значимые значения p указаны на графиках: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Результаты и обсуждение

Ранее нами было показано, что нейтрофилы, выделенные из образцов крови многих пациентов с ХГБ, обладают повышенным спонтанным НЕТозом, достигающим в некоторых случаях 5–10%. Такое состояние указывало на преактивацию нейтрофилов в организме, ведущую к aberrантному НЕТозу.

Если активация НЕТоза под действием кальциевого ионофора A23187 у дефицитных по NADPH-оксидазе нейтрофилов приводит к избыточному входу Ca^{2+} подобно тому, как это происходит при активации лигандами типа fMLP [6], можно ожидать, что инкубация таких клеток с хелатором внутриклеточного Ca^{2+} ВАРТА-АМ не должна вызывать существенного подавления НЕТоза. Вместе с тем, НЕТоз, индуцированный A23187 у нейтрофилов здоровых доноров, должен быть подавлен ВАРТА-АМ эффективно и дозозависимым способом, что и было проверено в нашей работе.

Диагноз ХГБ у всех исследованных больных был поставлен на основании абсолютного отсутствия у них окислительного взрыва в ответ на зимозан, что было определено методом регистрации люминол- и люцигенин-зависимой хемилюминесценции в ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, а также генетического подтверждения с помощью секвенирования по Сенгеру в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Минздрава России. Все больные с ХГБ имели одну из мутаций в гене *CYBB*, кодирующем субъединицу gp91phox (X-сцепленная ХГБ).

С использованием регистрации люминол-зависимой ХЛ мы подтвердили, что у всех пациентов с ХГБ нейтрофилы не образуют АФК в ответ на стимуляцию ФМА, fMLP или A23187, то есть являются полностью дефицитными по NADPH-оксидазе (данные не приведены). Кроме того, такие нейтрофилы не образовывали NET в ответ на ФМА (рис. 1, Д), поскольку для ФМА-индуцированного НЕТоза требуется наличие АФК [13]. Вместе с тем ионофор A23187 инду-

цировал НЕТоз через 4 ч (рис. 1, В, Д). Инкубация нейтрофилов здоровых доноров с ВАРТА-АМ приводила к дозозависимому и эффективному подавлению НЕТоза, индуцированного как А23187, так и ФМА (рис. 1, А, Б), в то время как инкубация дефицитных по NADPH-оксидазе нейтрофилов с ВАРТА-АМ практически не вела к подавлению выброса хроматина (рис. 1, В, Д).

Мы полагаем, что отсутствие подавления А23187-индуцированного НЕТоза хелатором

ВАРТА-АМ у дефицитных по NADPH-оксидазе нейтрофилов (ХГБ) связано с избыточным входом внеклеточного Ca^{2+} внутрь клетки. При активации нейтрофилов с помощью fMLP происходит быстрое открытие каналов CRAC и последующее закрытие этих каналов, обусловленное деполяризацией мембраны. В нейтрофилах пациентов с ХГБ деполяризация мембраны не происходит и каналы CRAC остаются открытыми, обеспечивая избыточный вход внеклеточного Ca^{2+} [6]. По-

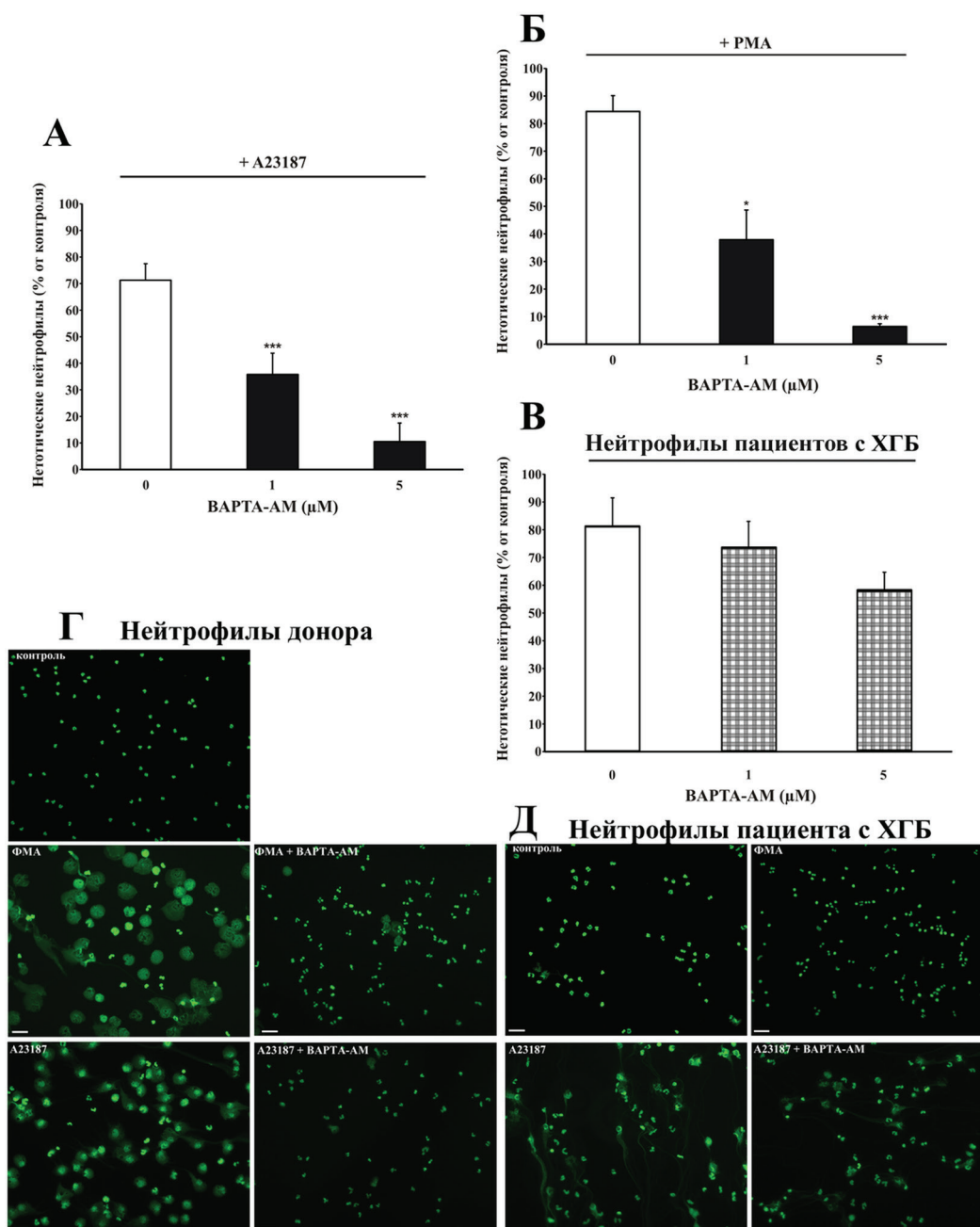


Рис. 1. Действие ингибитора внутриклеточного Ca^{2+} ВАРТА-АМ на ФМА- и А23187-индуцированный НЕТоз

Нейтрофилы, выделенные из крови здоровых доноров (А, Б, Г) и пациентов с ХГБ (В, Д), адгезировали на покровных стеклах и далее инкубировали с ВАРТА-АМ в возрастающих концентрациях в течение 20 мин при 37°C. НЕТоз индуцировали А23187 или ФМА в течение 4 ч и 2 ч 40 мин соответственно. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего для нейтрофилов здоровых доноров (n=3) и нейтрофилов пациентов с ХГБ (n=3). * – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$. На фотографиях представлены нейтрофилы здорового донора (Г) и нейтрофилы пациента с ХГБ (Д), прединкубированные с 5 мкМ ВАРТА-АМ в течение 20 мин при 37°C и стимулированные ФМА или А23187. Масштаб – 25 мкм. Увеличение 20 \times .

добное открытие каналов CRAC может происходить и под действием A23187 благодаря высвобождению Ca^{2+} из внутриклеточных депо, хотя этот эффект по данным Магомед и Андерсон [18] может быть слабо выражен. Возможно, перенос Ca^{2+} , катализируемый ионофорами, также тормозится при деполяризации мембраны. Однако это может быть связано с тем, что наряду с электронейтральным обменом ионов Ca^{2+} на протоны A23187 и иономицин переносят через мембрану положительно-заряженные комплексы Ca^{2+} [19].

Нам было интересно выяснить, как истощение внутриклеточного Ca^{2+} будет действовать на такую эффекторную функцию нейтрофилов, как окислительный взрыв. В следующей серии экспериментов нейтрофилы здоровых доноров инкубировали в присутствии ВАРТА-АМ в течение 20 мин и далее стимулировали окислительный взрыв A23187, ФМА и рецепторным активатором хемоаттрактантом fMLP. На рис. 2 можно видеть, что ВАРТА-АМ дозозависимо подавлял окислительный взрыв, индуцированный A23187 и fMLP, но не ФМА. Кроме того, ФМА-индуцированный окислительный взрыв происходил с одинаковой интенсивностью как в кальцийсодержащей, так и в безкальциевой среде (данные не приведены). Эти результаты указывают на то, что активация NADPH-оксидазы форболовым эфиром может происходить в отсутствие притока внеклеточного Ca^{2+} , что совпадает с данными других авторов [20], а фосфорилирование субъединиц ферментного комплекса может обеспечиваться Ca^{2+} -нечувствительными изоформами протеинкиназы C (PKC δ , PKC ξ).

Что касается ФМА-индуцированного НЕТоза, то, вероятно, основной мишенью ВАРТА-АМ в этом сигнальном пути является Ca^{2+} -чувствительный фермент PAD4.

Ранее мы показали [14], что A23187-индуцированный НЕТоз нейтрофилов здоровых доноров и нейтрофилов, дефицитных по NADPH-оксидазе, происходит с участием митохондриальных АФК (мтАФК). В то же время в нормальных нейтрофилах активация NADPH-оксидазы также была необходима для индукции НЕТоза. Повидимому, генерация мтАФК существенно повышена при дефиците NADPH-оксидазы. Результаты, полученные в настоящей работе, позволяют объяснить этот феномен. Повышенный уровень внутриклеточного Ca^{2+} у дефицитных по NADPH-оксидазе нейтрофилов должен стимулировать дегидрогеназы в матриксе митохондрий и дыхание, способствуя усиленному образованию мтАФК. Кроме того, мы установили, что A23187-зависимый нетотический сигнальный каскад происходит при активации митохондриальной поры, mPTP [14]. Повышенное содержание Ca^{2+} в митохондриях нейтрофилов, дефицитных по NADPH-

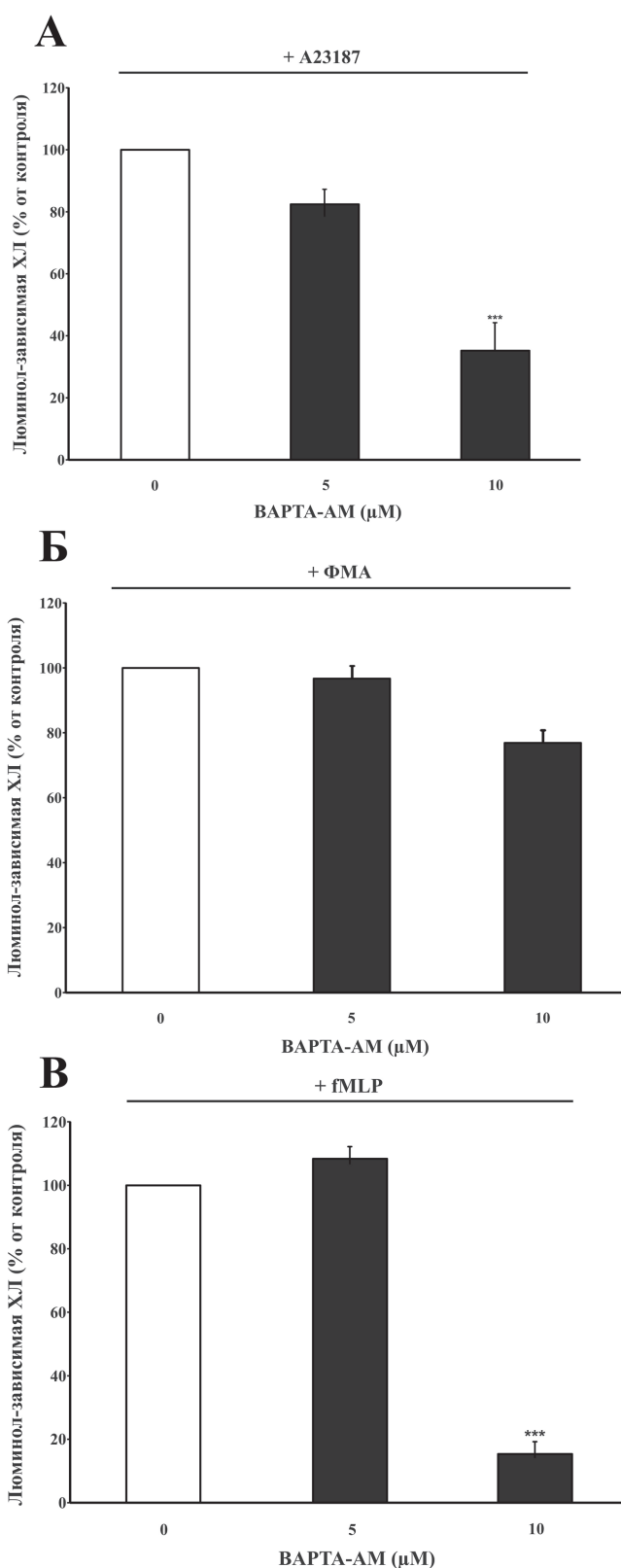


Рис. 2. Оценка окислительного взрыва у нейтрофилов здоровых доноров.

Нейтрофилы здоровых доноров инкубировали в течение 20 мин в присутствии ВАРТА-АМ при 37°C. Далее стимулировали окислительный взрыв 2,5 мкМ A23187 (А), 30 нМ ФМА (Б) или 800 нМ fMLP (В) в присутствии люминола (80 мкМ) и регистрировали хемилюминесценцию как указано в разделе «Материалы и методы». Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего ($n = 5$). *** – $p < 0,001$.

оксидазе, повышает вероятность открытия пор mPTP, что также ведет к усиленной генерации мтАФК. Интересно, что в нейтрофилах пациентов с ХГБ наблюдалась повышенная Ca²⁺-зависимая продукция липидного медиатора воспаления лейкотриена В4 [21]. Можно полагать, что избыточный уровень Ca²⁺ и мтАФК определяет как аберрантный НЕТоз, так и другие воспалительные процессы, ведущие к аутоиммунным и воспалительным заболеваниям, от которых часто страдают пациенты с ХГБ.

Таким образом, в нашей работе было впервые показано, что нейтрофилы пациентов с ХГБ не только ограничены в своей возможности бороться

с большим числом патогенов, но также имеют значительные отклонения в кальциевой регуляции и, как следствие, нарушение такого Ca²⁺-зависимого процесса, как НЕТоз.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №17-00-00088). Исследования были одобрены локальным комитетом по этике Российской детской клинической больницы ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Segal A.W. The NADPH oxidase and chronic granulomatous disease // *Mol. Med. Today*. 1996. Vol. 2. N 3. P. 129–135.
2. Leto T.L. The respiratory burst oxidase // *Inflammation basic principles and clinical correlates* / Eds. J.I. Gallin and R. Snyderman. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 1999. P. 769–787.
3. Scharff O., Foder B. Regulation of cytosolic calcium in blood cells // *Physiol. Rev*. 1993. Vol. 73. N 3. P. 547–582.
4. Mikoshiba K. Role of IP3 receptor signaling in cell functions and diseases // *Adv. Biol. Regul*. 2015. Vol. 57. P. 217–227.
5. Clemens R.A., Lowell C.A. CRAC channel regulation of innate immune cells in health and disease // *Cell. Calcium*. 2019. Vol. 78. P. 56–65.
6. Geiszt M., Kapus A., Németh K., Farkas L., Ligeti E. Regulation of capacitative Ca²⁺ influx in human neutrophil granulocytes. Alterations in chronic granulomatous disease // *J. Biol. Chem*. 1997. Vol. 272. N 42. P. 26471–26478.
7. Geiszt M., Kapus A., Ligeti E. Chronic granulomatous disease: more than the lack of superoxide? // *J. Leukoc. Biol*. 2001. Vol. 69. N 2. P. 191–196.
8. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria // *Science*. 2004. Vol. 303. N 5663. P. 1532–1535.
9. Steinberg B.E., Grinstein S. Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death // *Sci. STKE*. 2007. Vol. 2007. N 379. P. pe11.
10. Metzler K.D., Goosmann C., Lubojemska A., Zychlinsky A., Papayannopoulos V. A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis // *Cell. Rep*. 2014. Vol. 8. N 3. P. 883–896.
11. Pinegin B., Vorobjeva N., Pinegin V. Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity // *Autoimmun. Rev*. 2015. Vol. 14. N 7. P. 633–640.
12. Neeli I., Radic M. Opposition between PKC isoforms regulates histone deimination and neutrophil extracellular chromatin release // *Front. Immunol*. 2013. Vol. 4: 38.
13. Fuchs T.A., Abed U., Goosmann C., Hurwitz R., Schulze I., Wahn V., Weinrauch Y., Brinkmann V., Zychlinsky A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps // *J. Cell. Biol*. 2007. Vol. 176. N 2. P. 231–241.
14. Vorobjeva N., Galkin I., Pletjushkina O., Golyshev S., Zinovkin R., Prikhodko A., Pinegin V., Kondratenko I., Pinegin B., Chernyak B. Mitochondrial permeability transition pore is involved in oxidative burst and NETosis of human neutrophils // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis*. 2020. Vol. 1866. N 5: 165664.
15. Douda D.N., Khan M.A., Grasemann H., Palaniyar N. SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2015. Vol. 112. N 9. P. 2817–2822.
16. Vorobjeva N., Prikhodko A., Galkin I., Pletjushkina O., Zinovkin R., Sud'ina G., Chernyak B., Pinegin B. Mitochondrial reactive oxygen species are involved in chemoattractant-induced oxidative burst and degranulation of human neutrophils in vitro // *Eur. J. Cell. Biol*. 2017. Vol. 96. N 3. P. 254–265.
17. Vorobjeva N.V., Pinegin B.V. Effects of the antioxidants Trolox, Tiron and Tempol on neutrophil extracellular trap formation // *Immunobiology*. 2016. Vol. 221. N 2. P. 208–219.
18. Mahomed A.G., Anderson R. Activation of human neutrophils with chemotactic peptide, opsonized zymosan and the calcium ionophore A23187, but not with a phorbol ester, is accompanied by efflux and store-operated influx of calcium // *Inflammation*. 2000. Vol. 24. N 6. P. 559–569.
19. Fasolato C., Pozzan T. Effect of membrane potential on divalent cation transport catalyzed by the “Electroneutral” ionophores A23187 and ionomycin // *J. Biol. Chem*. 1989. Vol. 264. N 33. P. 19630–19636.
20. Gupta A.K., Giaglis S., Hasler P., Hahn S. Efficient neutrophil extracellular trap induction requires mobilization of both intracellular and extracellular calcium pools and is modulated by cyclosporine A // *PLoS One*. 2014. Vol. 9: e97088.
21. Song Z., Huang G., Chiquetto Paracatu L., Grimes D., Gu J., Luke C.J., Clemens R.A., Dinayer M.C. NADPH oxidase controls pulmonary neutrophil infiltration in the response to fungal cell walls by limiting LTβ4 // *Blood*. 2020. Vol. 135. N 12. P. 891–903.

Поступила в редакцию 30.04.2020 г.

После доработки 03.06.2020 г.

Принята в печать 23.06.2020 г.

RESEARCH ARTICLE

NADPH oxidase modulates Ca^{2+} -dependent formation of neutrophil extracellular traps

N.V. Vorobjeva^{1,*}, B.V. Chernyak²

¹*Department of Immunology, Biology Faculty, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;*

²*A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–40, Moscow, 119992, Russia;*

**e-mail: nvvorobjeva@mail.ru*

Chronic granulomatous disease (CGD) is a severe inherited immunodeficiency characterized by recurrent bacterial and fungal infections and aberrant inflammation. The CGD phenotype is due to deficiency of phagocytic NADPH oxidase, unable to generate reactive oxygen species (ROS). Such phagocytes are limited in phagocytosis and degranulation as well as a unique means of combating pathogens, neutrophil extracellular traps (NETs) formation, in response to many receptor and pharmacological stimuli. However, activation of NET formation by neutrophils isolated from the blood of CGD patients in response to calcium ionophores was described in our recent study. As was shown previously, neutrophils deficient in NADPH oxidase are not only unable to form ROS, but also have deficiency in the electrogenic activity of the enzyme and membrane depolarization upon activation. Therefore, these neutrophils have impaired extracellular Ca^{2+} influx and, as a result, multiple disorders in the synthesis of pro-inflammatory cytokines. In the present study, we showed that NET formation by CGD neutrophils in response to calcium ionophore A23187 is accompanied by excessive accumulation of intracellular Ca^{2+} . We explain this disorder by the deficiency of the electrogenic function of mutant NADPH oxidase, which in healthy donor neutrophils causes membrane potential depolarization. The results obtained in our study indicate an important function of phagocytic NADPH oxidase as a modulator of Ca^{2+} -dependent signaling pathways, and potentially can be used for treatment of CGD.

Keywords: *human neutrophils, oxidative burst, reactive oxygen species, neutrophil extracellular traps, NETosis, chronic granulomatous disease*

Сведения об авторах

Воробьева Нина Викторовна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры иммунологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Тел.: 8-495-939-46-46. e-mail: *nvvorobjeva@mail.ru*

Черняк Борис Викторович — докт. биол. наук, проф., зав. лаб. биоэнергетики клетки НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-55-50; e-mail: *bchernyak1@gmail.com*