

КАЗАНСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
Институт фундаментальной медицины и биологии
Кафедра биохимии, биотехнологии и фармакологии

Ю.В. ФИЛИНА
Р.Р. МИФТАХОВА
Р.Г. КИЯМОВА
А.Г. ГАБДУЛХАКОВА

**КЛЕТКИ ВРОЖДЕННОЙ ИММУННОЙ
СИСТЕМЫ: МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ
И ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ
АКТИВНОСТИ**

Учебное пособие



КАЗАНЬ

2024

УДК 577.112.083(075.8)

ББК 28.072я73

Ф53

*Печатается по рекомендации учебно-методической комиссии
Института фундаментальной медицины и биологии
Казанского (Приволжского) федерального университета
(протокол № 4 от 16 марта 2022 г.),
кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии
Института фундаментальной медицины и биологии
Казанского (Приволжского) федерального университета
(протокол № 5 от 19 января 2021 г.)*

Рецензенты:

кандидат медицинских наук **М.И. Арлеевская**;
кандидат биологических наук **В.Г. Сафронова**

Филина Ю.В.

Ф53 Клетки врожденной иммунной системы: методы выделения и оценки функциональной активности [Электронный ресурс]: учебное пособие / Ю.В. Филина, Р.Р. Мифтахова, Р.Г. Киямова, А.Г. Габдулхакова. – Электронные текстовые данные (1 файл: 3,33 Мб). – Казань: Издательство Казанского университета, 2024. – 106 с. – Системные требования: Adobe Acrobat Reader. – URL: <http://>. – Загл. с титул. экрана.

ISBN 978-5-00130-799-0

Учебное пособие составлено в дополнение к теоретическому курсу «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация». В пособии рассмотрены функции клеток врожденной иммунной системы и их механизмы, которые реализуются через специфические рецепторы и их сигнальные каскады. Учебное пособие познакомит читателей с методами выделения гранулоцитов и оценки их функциональной активности. Полученные знания позволят сформировать у студента представления о функциональном значении фагоцитов и молекулярных механизмах, обеспечивающих реализацию их функций.

Учебное пособие предназначено для студентов (бакалавров и магистрантов) и аспирантов вузов, обучающихся по биологическим, медицинским и ветеринарным направлениям.

УДК 577.112.083(075.8)

ББК 28.072я73

ISBN 978-5-00130-799-0

© Филина Ю.В., Мифтахова Р.Р., Киямова Р.Г., Габдулхакова А.Г., 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	8
ГЛАВА 1. ФУНКЦИИ ГРАНУЛОЦИТОВ	15
1.1. Хемотаксис.....	15
1.1.1. Хемотаксические липиды	18
1.1.2. Анафилотоксины комплемента	19
1.1.3. Формилированные пептиды	19
1.1.4. Хемокины	20
1.1.5. Рецепторы хемоаттрактантов и их сигнальные пути.....	21
1.2. Фагоцитоз	24
1.2.1. Фагоцитоз опсонизированных частиц.....	25
1.2.2. Фагоцитоз неопсонизированных частиц.....	26
1.3. Респираторный взрыв	27
1.3.1. Активные формы кислорода.....	27
1.3.2. Структура НАДФН-оксидазного комплекса	29
1.3.3. АФК и иммунитет.....	35
1.3.4. Окислительный стресс и регуляция продукции АФК	37
1.4. Секреторная дегрануляция	39
1.4.1. Гранулы нейтрофилов	39
1.4.2. Противомикробные белки.....	43
1.5. Нетоз	43
ГЛАВА 2. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ГРАНУЛОЦИТОВ.....	45
2.1. Цельная кровь как источник лейкоцитов	45
2.2. Лейкоциты в костном мозге	47
2.3. Выделение лейкоцитов из крови и костного мозга	48
2.3.1. Приготовление растворов	48
2.3.2. Выделение общей популяции лейкоцитов методом осаждения декстраном	49
2.3.3. Выделение лейкоцитов мыши с применением желатина	51
2.3.4. Центрифугирование на градиенте плотности.....	52
2.4. Метод вызванных фагоцитов	58

2.5. Получение очищенных популяций лейкоцитов иммунологическими методами	59
ГЛАВА 3. ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ГРАНУЛОЦИТОВ...	62
3.1. Анализ миграции клеток.....	62
3.2. Исследование продукции активных форм кислорода	65
3.2.1. Люминол-зависимая хемилюминесценция.....	67
3.2.2. Оценка продукции АФК с помощью флуоресценции	69
3.2.3. Тест на восстановление нитросинего тетразолия	71
3.3. Оценка созревания и окисления фагосом.....	73
3.3.1. Исследование созревания фагосом с помощью рН-чувствительного флуоресцентного зонда	74
3.3.2. Оценка окисления фагосом с помощью флуориметрии..	76
3.4. Анализ дегрануляции.....	77
3.4.1. Подготовка образцов для анализа.....	77
3.4.2. Измерение активности миелопероксидазы.....	78
3.4.3. Измерение активности протеолитических ферментов гранул	80
3.5. Исследование внеклеточных ловушек нейтрофилов	82
3.5.1. Флуориметрический анализ НВЛ	83
3.5.2. Визуализация НВЛ при помощи флуоресцентной микроскопии	85
Приложение 1 Справочная информация	86

СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

ACKR	Атипичные рецепторы хемокинов (англ. Atypical chemokine receptors)
CXCR	Рецепторы хемокинов (англ. C-X-C chemokine receptors)
CR	Рецептор(-ы) комплемента (англ. Complement receptors)
DAG	ДАГ, диацилглицерин (англ. Diacylglycerol)
DAMP	Молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением (англ. Damage-associated molecular patterns)
ERK	Киназа, регулируемая внеклеточными сигналами (англ. Extracellular signal-regulated kinase)
fMLF	фМЛФ, N-формилметионин-лейцил-фенилаланин (англ. N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine)
FCR	Рецептор(-ы) F _c (кристаллизующегося фрагмента иммуноглобулина, англ. fragment crystallizable region)
FPR	Рецепторы формилированных пептидов (англ. Formyl peptide receptors)
GAP	ГТФаза-активирующий белок (англ. GTPase-activating protein)
G-CSF	Г-КСФ, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (англ. Granulocyte colony-stimulating factor)
GM-CSF	ГМ-КСФ, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (англ. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor)
GDI	Ингибитор диссоциации гуанина (англ. Guanine nucleotide dissociation inhibitor)
GEF	Фактор обмена гуанина (англ. Guanine nucleotide exchange factor)
GPCR	Рецепторы, сопряженные с G-белком (англ. G-protein-coupled receptors)
GRK	Киназы рецепторов, связанных с G-белками (англ. G-protein-coupled receptor kinases)
IP3	ИФ3, инозитол 1,4,5-трифосфат (англ. Inositol 1,4,5-trisphosphate)

ITAM	Активационный мотив иммунорецептора на основе тирозина (англ. Immunoreceptor tyrosine-based activation motif)
ITIM	Ингибиторный мотив иммунорецептора на основе тирозина (англ. Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif)
LTA4	ЛТА4, лейкотриен А4 (англ. Leukotriene A4)
LTB4	ЛТБ4, лейкотриен Б4 (англ. Leukotriene B4)
LXA	Липоксин (англ. Lipoxin)
МАРК	Митоген-активируемая протеинкиназа (англ. Mitogen-activated protein kinase)
РАФ	ФАТ, фактор активации тромбоцитов (англ. Platelet-activating factor)
РАFR	Рецептор фактора активации тромбоцитов (англ. Platelet-activating factor receptor)
PAMPs	Молекулярные паттерны, ассоциированные с патогенами (англ. Pathogen-associated molecular patterns)
PI3K	Фосфатидилинозитол-3-киназа(-ы) (англ. Phosphoinositide 3-kinase)
PIP2	Фосфатидил-инозитол-4,5-бифосфат (англ. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate)
PIP3	Фосфатидил-инозитол-3,4,5-трифосфат (англ. Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate)
PKB	Протеинкиназа В (англ. Protein kinase B, также известна как АКТ)
PKC	Протеинкиназа(-ы) С (англ. Protein kinase C)
PLC	Фосфолипаза С (англ. Phospholipase C)
PTEN	Гомолог фосфатазы и тензина (англ. Phosphatase and tensin homolog)
TLR	Толл-подобные рецепторы (англ. Toll-like receptors)
АПК	Антиген-презентирующие клетки
АФК	Активные формы кислорода (англ. ROS, Reactive oxygen species)
ДК	Дендритные клетки

ИЛ	Интерлейкин (англ. IL, interleukin)
ИФН	Интерферон
ЛПС	Липополисахарид (англ. LPS, lipopolysaccharide)
МПО	Миелопероксидаза
НВЛ	Нейтрофильные внеклеточные ловушки (англ. NETs, neutrophil extracellular traps)
НСТ	Нитросиний тетразолий
СОД	Супероксиддисмутаза
ФНО-α	Фактор некроза опухоли-альфа (англ. TNF- α , tumor necrosis factor-alpha)
ХГБ	Хроническая грануломатозная болезнь
ХЛ	Хемилюминесценция

ВВЕДЕНИЕ

Иммунная система отвечает за защиту организма от разнообразных инфекционных агентов и собственных поврежденных/апоптотических/некротических клеток. Первая линия защиты обеспечивается барьерными механизмами кожи и слизистых и клетками врожденной иммунной системы, к которым относятся гранулоциты, макрофаги и дендритные клетки. Эти клетки способны к хемотаксису, захвату (фагоцитированию) инфекционных агентов, их перевариванию внутри фаголизосом, продукции цитотоксических факторов. Еще одной частью врожденного иммунитета являются натуральные (естественные) киллеры, которые специализируются на поиске и уничтожении собственных клеток организма, инфицированных вирусами или измененных вследствие онкологической трансформации.

Клетки врожденной иммунной системы играют решающую роль в инициации и последующем направлении адаптивных иммунных ответов, а также участвуют в удалении патогенов, на которые нацелен адаптивный иммунный ответ. Более того, поскольку для развертывания адаптивного иммунного ответа обычно нужно 4-7 дней, врожденный иммунный ответ играет решающую роль в борьбе с инфекциями в течение этого периода.

При попадании в организм микробы встречаются с клетками и молекулами, отвечающими за врожденный иммунный ответ (рис. 1). Макрофаги и дендритные клетки несут поверхностные рецепторы, которые способны распознавать и связывать общие компоненты многих патогенов – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны. Молекулы патогена стимулируют фагоцитоз и секрецию биологически активных веществ: цитокинов и хемокинов, которые привлекают из кровотока нейтрофилы и моноциты, то есть иницируют процесс воспаления. Местное воспаление и фагоцитоз могут быть вызваны активацией белков комплемента на поверхности бактериальных клеток. Каскад реакций высвобождает небольшие пептиды, которые также способствуют воспалению.

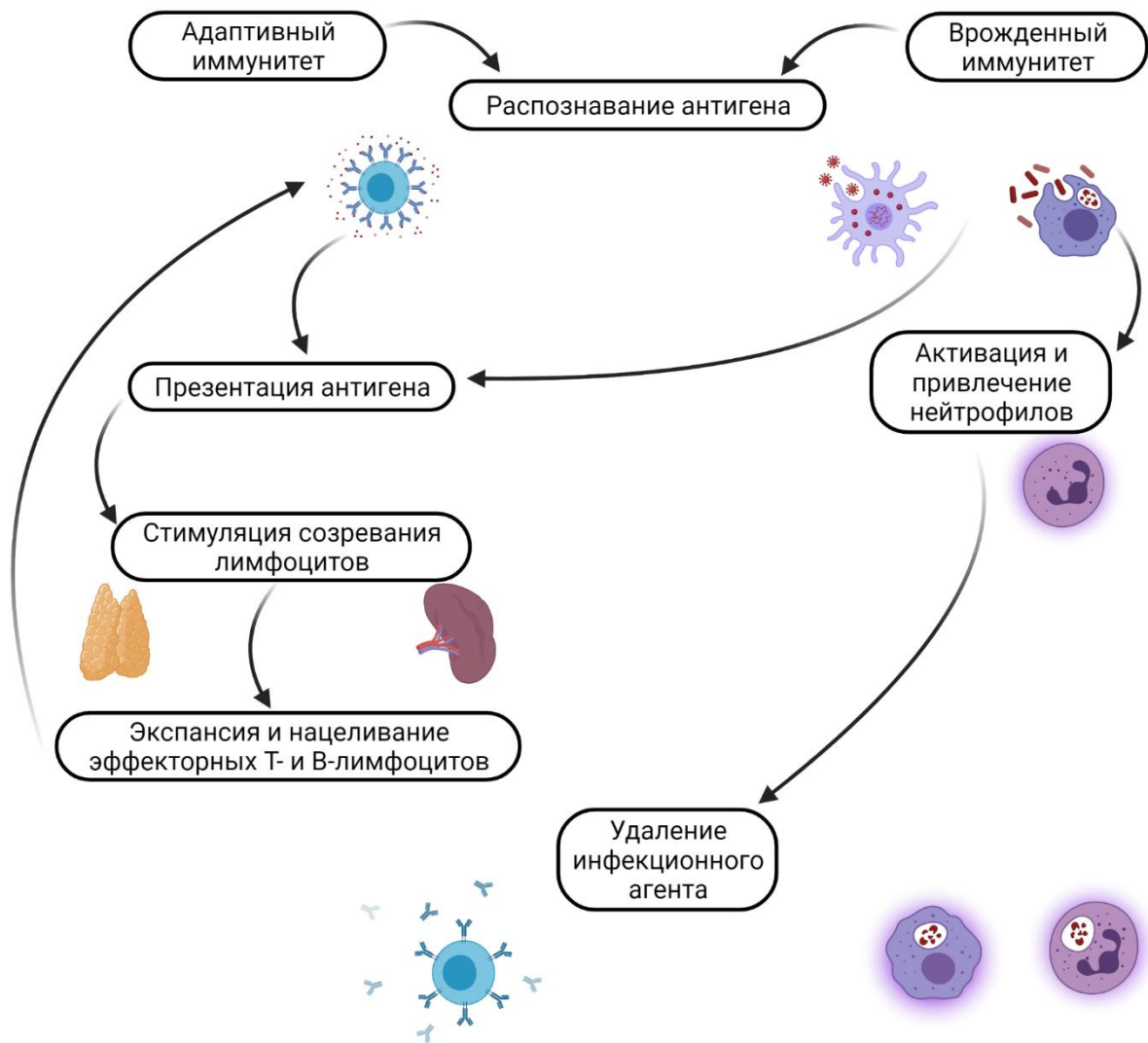


Рис. 1. Реализация иммунного ответа

Цитокины и фрагменты комплемента оказывают важное влияние на адгезивные свойства эндотелия, заставляя циркулирующие лейкоциты прилипать к эндотелиальным клеткам стенки кровеносных сосудов и мигрировать между ними к месту инфекции, куда их привлекают хемокины. Основными эффекторами на начальных этапах воспаления являются нейтрофилы, которые в большом количестве накапливаются в воспаленной инфицированной ткани. Как и макрофаги, они имеют поверхностные рецепторы для общих бактериальных компонентов и комплемента и уничтожают вторгшиеся микроорганизмы. Врожденный иммунный ответ вносит решающий вклад в активацию адаптивного иммунитета.

Воспалительная реакция сопровождается увеличением потока лимфы, содержащей антиген и антиген-презентирующие клетки (АПК), в лимфоидную ткань. Фрагменты комплемента на микробных поверхностях и индуцированные изменения в клетках, которые поглотили микроорганизмы, обеспечивают сигналы, которые синергически активируют лимфоциты, рецепторы которых связываются со специфическими микробными антигенами.

Индукция адаптивного иммунного ответа начинается, когда патоген встречается с незрелой дендритной клеткой в инфицированной ткани. Дендритные клетки (ДК) в течение жизни находятся в тканях. Незрелая дендритная клетка несет на своей поверхности рецепторы, которые распознают общие молекулы антигенов, например, протеогликаны клеточной стенки бактерий. Незрелые дендритные клетки также постоянно поглощают внеклеточный материал, включая любые вирусные частицы или бактерии, посредством рецептор-независимого механизма макропиноцитоза.

Функция дендритных клеток состоит в первую очередь не в уничтожении патогенов, а в переносе антигенов к периферическим лимфоидным органам и их передаче Т-лимфоцитам. Если дендритная клетка захватывает патоген в инфицированной ткани, она активируется и перемещается к лимфатическому узлу. Активация запускает созревание и превращение ДК в высокоэффективную антиген-презентирующую клетку, что позволяет ей активировать патоген-специфические лимфоциты. Активированные дендритные клетки секретируют цитокины, которые влияют как на врожденный, так и на адаптивный иммунный ответ, определяя, будет ли и каким образом будет иммунная система реагировать на присутствие инфекционных агентов [1].

Адаптивная иммунная система по сравнению с врожденной более специфична – она может быть нацелена на определенный антиген и помогает справиться с патогенами, которые не смогла обезвредить система врожденного иммунитета. Адаптивный иммунный ответ более медленный, но более точный, к тому же он обеспечивает за-

щиту от последующей повторной инфекции [1].

К клеткам адаптивной иммунной системы относятся Т- и В-лимфоциты. Лимфоциты – небольшие клетки с однородной цитоплазмой. В-лимфоциты продуцируют антитела, Т-лимфоциты отвечают за уничтожение инфицированных вирусами клеток и регулируют активность других клеток иммунной системы. Для ответа лимфоцитов требуются два сигнала: связывание антигена с рецепторами и сигнал от другой иммунной клетки. Наивные Т-клетки обычно активируются ДК, для В-клеток активаторами служат сигналы Т-клеток. Макрофаги также могут напрямую опосредовать врожденные иммунные ответы и вносить вклад в эффекторную фазу адаптивного иммунного ответа. В-клетки презентруют части антигенов и секретируют антитела, которые могут распознавать практически на любой антиген. В организме одновременно присутствует множество различных потенциально продуцирующих антитела клеток, каждая из которых обладает способностью вырабатывать антитела с разной специфичностью, эти антитела служат рецептором для антигена. При связывании антигена клетка активируется, чтобы делиться и производить множество идентичных потомков – клонов, за счет чего происходит клональная экспансия лимфоцитов.

Лимфоциты, моноциты и гранулоциты составляют три основных типа лейкоцитов (рис. 2). Т- и В-лимфоциты, а также натуральные киллеры, относятся к клеткам лимфоидного ряда и происходят от общего предшественника лимфоцитопоэза. Моноциты и гранулоциты происходят от общего предшественника миелопоэза, который дифференцируется в миелобласт. Миелобласт далее превращается в монобласт, из которого происходят моноциты, или промиелоцит, который дифференцируется через ряд потомков в три вида гранулоцитов: нейтрофилы, базофилы и эозинофилы.

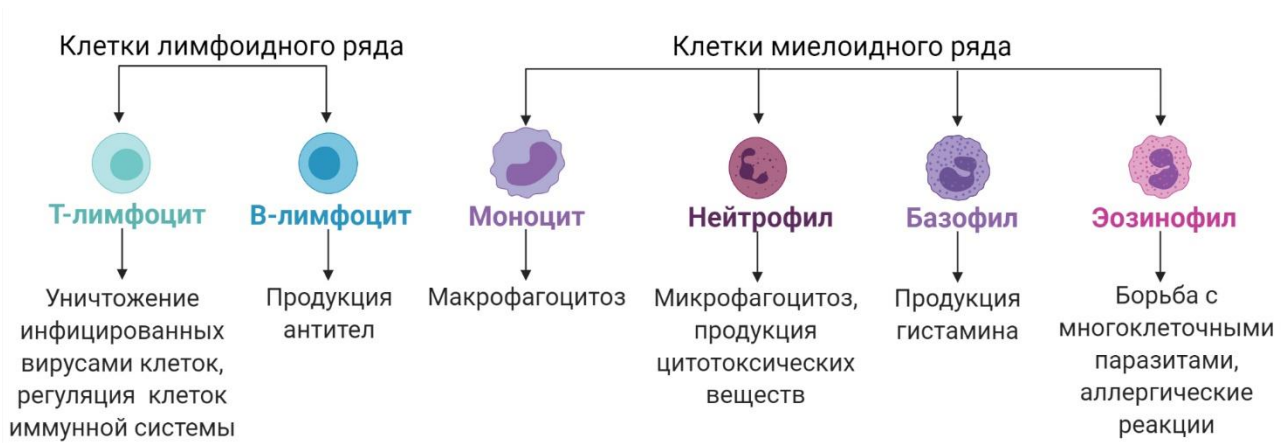


Рис. 2. Основные типы лейкоцитов и их функции

Моноциты, которые при миграции в ткани превращаются в макрофаги, совместно с гранулоцитами составляют группу фагоцитов. Фагоциты содержат специфические лизосомы, которые сливаются с фагоцитарными везикулами (фагосомами) и уничтожают фагоцитированные микроорганизмы с помощью высокореакционных молекул супероксида ($\cdot O_2^-$) и гипохлорита ($HOCl$), а также концентрированной смеси лизосомальных гидролитических ферментов. Макрофаги намного крупнее и долговечнее гранулоцитов. Они отвечают за распознавание и удаление стареющих, мертвых и поврежденных клеток и обладают способностью поглощать крупные микроорганизмы [2, 3].

Гранулоциты являются наиболее распространенными лейкоцитами в организме человека. Гранулоциты и/или их предшественники обычно составляют до 60-70 % ядерных клеток в костном мозге и кровотоке. Гранулоциты содержат многочисленные лизосомы и секреторные везикулы (или гранулы) и подразделяются на три класса в соответствии с морфологией и окраской органелл. Базофилы секретируют гистамин, провоцируя воспалительные реакции. Эозинофилы помогают уничтожать паразитов и модулировать аллергические воспалительные реакции. Нейтрофилы составляют основную часть гранулоцитов и, в целом, лейкоцитов и отвечают за врожденный противомикробный иммунитет [4]. Нейтрофилы – крайне подвижные клетки, которые способны отвечать на широкий спектр стимулов, особенно на так называемые «патоген- и повреждение-ассоциированные молекуляр-

ные паттерны» (англ. pathogen/damage-associated molecular patterns – PAMPs/DAMPs) [5]. Нейтрофилы «общаются» с макрофагами, дендритными клетками лимфоцитами с помощью межклеточных контактов или растворимых медиаторов [6, 7].

Зрелые нейтрофилы человека живут в крови 6-8 часов, а затем еще около 2-3 дней в тканях. В норме в костном мозге взрослого человека ежедневно продуцируется около $1-2 \times 10^{11}$ нейтрофилов. Во время инфекции продолжительность жизни нейтрофилов увеличивается, усиливается гранулоцитопоез, и большое количество нейтрофилов быстро рекрутируется в очаг инфекции. Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF) и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) могут повышать количество и ускорять созревание нейтрофилов во время инфекции [8, 9].

Традиционно гранулоциты рассматривались как простые короткоживущие клетки, которые высвобождают антимикробные агенты в очаге воспаления, пока более специализированные клетки не придут туда и не запустят эффективную атаку на патогены. Однако современные технологии показывают, что функции нейтрофилов гораздо сложнее. Они гетерогенны, как фенотипически, так и функционально, и играют важную роль в развитии заболеваний [10]. Доказано, что нейтрофилы участвуют в запуске, регуляции и прекращении воспалительных реакций, вовлечены в заживление ран и поддержание гомеостаза тканей. Более того, нейтрофилы активно участвуют в регуляции функций других иммунных клеток [7, 11].

После распознавания и фагоцитоза нейтрофилы используют набор микробицидных средств для уничтожения инфекционных агентов. К кислород-зависимым микробицидным средствам относятся активные формы кислорода (АФК), кислород-независимые включают дегрануляцию и высвобождение литических ферментов и бактерицидных пептидов [4]. Помимо фагоцитоза, продукции АФК и дегрануляции крайне активированные нейтрофилы могут выбрасывать сеть из нитей ДНК с протеазами и антибактериальными молекулами,

так называемые нейтрофильные внеклеточные ловушки (НВЛ, англ. neutrophil extracellular traps, NET) [12].

Очевидно, что высокий цитотоксический потенциал подразумевает, что активация и миграция нейтрофилов находится под жесткой регуляцией для предотвращения избыточного воспаления, которое может привести к поражению тканей. Передвижение и активация нейтрофилов зависит от взаимодействия целого комплекса адгезионных молекул, цитокинов и протеаз, ключевую роль в этих процессах играют хемоаттрактанты и их рецепторы.

Таким образом, врожденная иммунная система в лице гранулоцитов и моноцитов/макрофагов обеспечивает неспецифическую реакцию против любых чужеродных агентов, внедрившихся в организм: бактерий, вирусов, грибов, синтетических препаратов. К защитным механизмам относятся хемотаксис, фагоцитоз, секреторная дегрануляция, продукция активных форм кислорода и азота [4]. Реализация функций врожденного иммунитета в данном учебном пособии будет рассмотрена на примере гранулоцитов, а именно нейтрофилов.

Вопросы для самоконтроля:

1. Какие типы иммунных клеток вы знаете?
2. Каковы основные функции лимфоцитов?
3. Каковы основные функции гранулоцитов и моноцитов?

ГЛАВА 1. ФУНКЦИИ ГРАНУЛОЦИТОВ

1.1. Хемотаксис

Нейтрофилы находятся в авангарде врожденной иммунной системы, эти клетки снабжены впечатляющим антимикробным «арсеналом» и потому обладают мощным цитотоксическим потенциалом. Участие нейтрофилов является необходимым условием для борьбы с микробами, для сохранения гомеостаза, для модулирования воспаления и прекращения воспалительных реакций, для заживления ран и восстановления тканей. Для достижения очага воспаления нейтрофилы используют хемотаксис – движение клеток по градиенту растворенного вещества, представляющего «сигнал тревоги».

Гранулоциты и моноциты экспрессируют рецепторы хемоаттрактантов и хемокинов. Оба типа рецепторов активируют двигательные реакции клеток за счет реорганизации цитоскелета и формирования ламеллоподий. До недавнего времени считалось, что различие между хемоаттрактантами и хемокинами заключается в направленности движения: хемоаттрактанты вызывают направленное движение, тогда как хемокины просто хаотичное «броуновское» движение клеток. Однако, в свете данных о том, что рецепторы хемокинов ответственны за хоуминг (англ. homing) раковых клеток в костный мозг, это утверждение является не совсем верным и требует уточнения.

По биохимическим свойствам хемоаттрактанты можно разделить на четыре семейства: хемотаксические липиды (фактор активации тромбоцитов, лейкотриены), формилованные пептиды (fMLF и другие), анафилатоксины комплемента (C5a) и хемокины [13]. Хемотаттрактанты вовлечены в регуляцию выхода нейтрофилов из костного мозга, а также в пространственную и временную регуляцию перемещения нейтрофилов между органами. Хемотаттрактанты и хемокины преимущественно действуют через рецепторы, сцепленные с G-белками (англ. G-protein-coupled receptors, GPCRs), но существуют и атипичные рецепторы хемокинов (ACKR), которые не связаны с G-белками. Уровень экспрессии рецепторов зависит от степени созре-

вания нейтрофилов и уровня активации.

Зрелые нейтрофилы достигают очага воспаления или инфекции через посткапиллярные вены, где сосудистая стенка достаточно тонкая, и нейтрофилы могут контактировать с эндотелиальными клетками. Миграция нейтрофилов состоит из нескольких этапов: связывание хемоаттрактанта и активация селектин-опосредованного перекатывания нейтрофила по эндотелию; медленное перекатывание с последующим усилением адгезии посредством интегринов, проползание через эндотелий и окончательная миграция в ткани [6] (рис. 3). Воспаление или повреждение тканей запускает продукцию G-CSF, что стимулирует мобилизацию нейтрофилов из костного мозга в кровеносное русло. Взаимодействие между селектинами и их рецепторами запускает перекатывание нейтрофила вдоль эндотелия сосуда. Градиент хемоаттрактанта определяет направление миграции нейтрофила. В очаге инфекции нейтрофил может фагоцитировать (захватывать) патогены, генерировать АФК и другие микробицидные компоненты, высвободить ферменты для деградации, а также выбрасывать нейтрофильные внеклеточные ловушки.

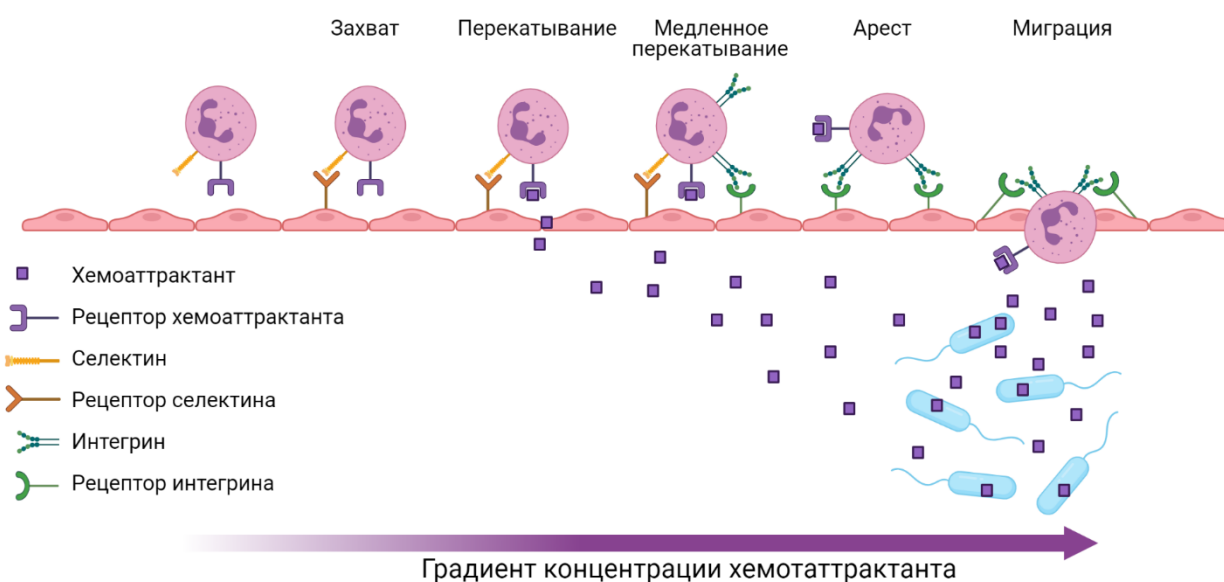


Рис. 3. Активация и миграция нейтрофилов в очаг воспаления под действием хемоаттрактантов

Сигнальные каскады при активации миграции клеток зависят от типа хемоаттрактанта и его рецептора. Эти молекулы запускают дозозависимую миграцию нейтрофилов, определяют направление движения, активируют усиление адгезии и регулируют финальную трансмиграцию. Схожесть в функциях хемоаттрактантов и особенностях их рецепторов может создавать ощущение избыточности, но каждый тип хемоаттрактантов регулирует движение нейтрофилов уникальным способом. Во-первых, хемоаттрактанты различаются по тому, в какой клетке организма они синтезируются, в какой временной промежуток и где высвобождаются. Во-вторых, промежуточные хемоаттрактанты (LTB₄ и хемокины) отличаются от конечных (формилированные пептиды и C5a): нейтрофилы в сложном окружении умеют расставлять приоритеты и следуют, в первую очередь, за конечными хемоаттрактантами. Таким образом, хемоаттрактанты слаженно действуют во времени и пространстве в соответствии со своей иерархией, чтобы регулировать миграцию клеток. Это было подтверждено в эксперименте на мышах на модели стерильного воспаления. Начальный хемотаксис нейтрофилов в здоровой ткани в сторону очага воспаления зависел от внутрисосудистого градиента хемокинов, а финальные этапы миграции в поврежденную ткань регулировались формилированными пептидами, которые высвобождались из погибающих клеток. В исследовании на мышинной модели цитотоксичности печени, индуцированной ацетаминофеном, было обнаружено что, хемокины, взаимодействующие с CXCR2, и продукты распада митохондриальных белков, связывающиеся с FPR, действуют сообща в активации миграции нейтрофилов и полномасштабного воспаления (по обз. [14]).

Разные семейства хемоаттрактантов активируют разные функции во время финальных этапов трансмиграции нейтрофилов. Например, хемокин CXCL2, высвобождаемый отчасти и нейтрофилами, выполняет определяющую роль в разрушении межклеточных соединений эндотелиальных клеток для облегчения миграции. Дей-

ствии хемоаттрактанта бактериального происхождения fMLF ведет к проникновению нейтрофилов сквозь эндотелиальные клетки.

Использование термина «хемоаттрактант» может привести к ложному впечатлению, что функция этих молекул ограничена регуляцией миграции, но хемоаттрактанты и их рецепторы также вовлечены в другие аспекты активации нейтрофилов, это крайне динамический процесс, выстроенный таким образом, чтобы обеспечить максимальный ответ в правильном месте и только тогда, когда это необходимо. Циркулирующие нейтрофилы находятся в состоянии покоя в гомеостатических условиях, но могут перейти в состояние «повышенной готовности» при встрече с воспалительными агентами, включая хемокины и фактор активации тромбоцитов (PAF), либо вследствие механического стресса. Это состояние повышенной готовности также называют праймированным состоянием. В зависимости от праймирующего агента и условий праймированный фенотип может быть временным или устойчивым. Праймированные нейтрофилы могут быть полностью активированы, но также могут и спонтанно вернуться в состояние покоя, что подчеркивает их пластичность. Активированные нейтрофилы реагируют более агрессивно при последовательной стимуляции LTB₄, fMLF и C5a за счет преактивации сигнальных компонентов, что было продемонстрировано по усиленной продукции АФК [15], дегрануляции, фагоцитозу и повышенной склонности к нетозу.

1.1.1. Хемотаксические липиды

LTB₄ вызывает хемотаксис различных лейкоцитов, но более известен как мощный хемоаттрактант именно нейтрофилов. Во время воспаления LTB₄ быстро синтезируется *de novo* в ответ на воспалительные цитокины (ИЛ-2 и фактор некроза опухоли альфа), бактериальные продукты (ЛПС) или другие хемоаттрактанты (PAF и C5a). LTB₄ секретруется клетками миелоидного ряда, то есть сами нейтрофилы служат важными продуцентами этого метаболита арахидоновой кислоты, и их активность может регулироваться LTB₄ по

механизму обратной связи. На начальных стадиях синтеза критично участие фермента фосфолипазы А₂, которая усиливает мобилизацию арахидоновой кислоты к ядерной мембране, где другой фермент, липоксигеназа, превращает арахидоновую кислоту в 5-НРЕТЕ, которая метаболизируется в LTA₄ и далее в LTB₄.

Другие хемотаксические липиды, факторы активации тромбоцитов PAF, регулируют множество функций, включая миграцию и активацию лейкоцитов. Факторы активации тромбоцитов относятся к гетерогенному классу молекул, которые различаются на основании того, какие группы находятся в sn-1 положении молекулы глицерина. Молекулы, содержащие алкильные группы C_{16:0}, C_{18:0} или C_{18:1}, имеют наибольший биологический потенциал среди различных факторов активации тромбоцитов. Синтез факторов активации тромбоцитов может запускаться множеством цитокинов, таких как ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-12 и ФНО-альфа, под действием ангиотензина II и эндотелина в различных иммунных клетках и тромбоцитах. PAF может продуцироваться как за счет модификации мембранных липидов, так и за счет *de novo* синтеза посредством многостадийного ферментативного процесса.

1.1.2. Анафилотоксины комплемента

Белки-предшественники комплемента синтезируются в печени и циркулируют в периферической крови в неактивном виде. Активация комплемента усиливает протеолитический сплайсинг пятого компонента комплемента (C₅) с образованием анафилотоксинов C_{5a} и C_{5b}. C_{5a} является основным продуктом активации комплемента, который обладает хемотаксическими свойствами в отношении нейтрофилов. C_{3a}, продукт протеолиза C₃, также обладает некоторой хемотаксической активностью, но даже несмотря на то, что нейтрофилы экспрессируют специфические рецепторы к C_{3a}, не способен вызвать полноценный ответ нейтрофилов.

1.1.3. Формилированные пептиды

Пептиды, которые несут в своем составе формилированный метионин (fMet) на *N*-конце, обычно образуются в результате деградации бактериальных и митохондриальных белков, формируя «патоген-ассоциированные» либо «повреждение-ассоциированные молекулярные паттерны», распознающиеся клетками врожденного иммунитета. Наиболее известный формил-метионин-содержащий пептид, fMLF – бактериальный продукт, который воздействует в качестве хемоаттрактанта на нейтрофилы и многие другие клетки. Человеческие нейтрофилы экспрессируют три типа рецепторов формилпептидов: FPR1, FPR2 (который также называют рецептором липоксина A4 (LXA4) или ALX) и FPR3. Рецепторы FPR1 и FPR2 способны отвечать на очень низкие концентрации бактериальных формилпептидов и фенол-растворимых модулинов [16].

1.1.4. Хемокины

Хемокины – это специализированные хемотаксические цитокины, продуцируемые различными клетками, в том числе лейкоцитами и клетками соединительной ткани. В настоящее время известно около 50 хемокинов и, по крайней мере, 19 их рецепторов. Они выполняют гомеостатическую и воспалительную функции, в зависимости от типа лиганда продуцируются постоянно либо в ответ на микробные или эндогенные воспалительные медиаторы.

Хемокины классифицируются по количеству цистеиновых остатков и промежуткам между ними в *N*-концевой области белка (СС, СХС, СХЗС и С). В отличие от других хемоаттрактантов, хемокины селективны по отношению к специфическим популяциям лейкоцитов. Функции хемокинов регулируются альтернативным сплайсингом их транскриптов, модуляцией транскрипции, стабильностью мРНК, взаимодействием с атипичными рецепторами хемокинов, посттрансляционными модификациями (цитруллинированием, гидролизом, присоединением азотсодержащих групп, гликозилированием) самих хемокинов и их рецепторов.

1.1.5. Рецепторы хемоаттрактантов и их сигнальные пути

Рецепторы хемоаттрактантов относятся к классу А G-белок сцепленных рецепторов (родопсиноподобные), то есть, при связывании агониста они передают сигнал внутрь клетки через гетеротримерные G-белки. Эти рецепторы содержат семь трансмембранных доменов, соединенных тремя внутриклеточными и тремя внеклеточными петлями. N-конец рецептора является экстраклеточным, C-конец внутриклеточным. Большинство клеточных ответов, возникающих вследствие связывания рецептора хемоаттрактанта с лигандом, чувствительно к действию коклюшного токсина, из чего было заключено, что эти рецепторы, в основной массе, связаны с ингибиторным подтипом альфа-субъединицы G-белка ($G_{\alpha i}$). Рецептор фактора активации тромбоцитов (PAFR) может также связываться с $G_{\alpha q}$ субъединицей, но хемотаксис, вызванный PAFR, зависит только от $G_{\alpha i}$ -опосредованных сигнальных событий [17]. После связывания с агонистом рецепторы хемоаттрактантов претерпевают конформационные изменения, что приводит к обмену ГДФ на ГТФ и диссоциации α -субъединицы от $\beta\gamma$ -димера. $G_{\alpha i}$ субъединица ингибирует аденилатциклазу, что вызывает снижение концентрации эндогенного цАМФ.

Субъединицы $G_{\beta\gamma}$ активируют, по крайней мере, два параллельных сигнальных каскада. Во-первых, активированный мембрано-ассоциированный фермент фосфолипаза С-бета ($PLC\beta$) гидролизует фосфоинозитол-(4,5)-бисфосфата (PIP_2) до диацилглицерола (DAG) и инозитолтрифосфата (IP_3), последний вызывает мобилизацию кальция из эндоплазматического ретикулума и активацию кальций-зависимых протеинкиназ, включая различные изоформы протеинкиназы С (PKC). Во-вторых, субъединицы $G_{\beta\gamma}$ активируют фермент фосфоинозитол-3-киназу ($PI3K$) гамма, которая фосфорилирует PIP_2 с образованием фосфоинозитол-(3,4,5)-трифосфата (PIP_3), с последующей активацией киназ, регулируемых внеклеточными сигналами (англ. extracellular signal-regulated kinases, ERK), и протеинкиназы В (PKB; также известна как АКТ).

Нейтрофилы экспрессируют три тирозиновые киназы семейства

Src: Hck, Fgr и Lyn, которые могут быть вовлечены в сигнализацию, вызванную хемоаттрактантами. По всей видимости, функционально активация Src-киназ может быть важна для последующей активации p38 митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК) [18]. Механизм активации Src-киназ до сих пор не ясен, предполагается участие бета-аррестинов, субъединиц G-белка и/или непосредственно самого рецептора; по-видимому, эта активация идет параллельно с PI3K- и PLC β -зависимой сигнализацией [19].

Важно, что сигнальные пути промежуточных и конечных хемоаттрактантов отличаются. Так, активация рецептора промежуточным хемоаттрактантом зависит от PI3K и PTEN-зависимых путей, тогда как конечные хемоаттрактанты вызывают Src-зависимое фосфорилирование p38 МАРК [20]. Следует отметить, что рецепторы конечных хемоаттрактантов, предположительно, обладают высокой конститутивной активностью по сравнению с рецепторами промежуточных хемоаттрактантов. Отличительная особенность GPCR, включая и рецепторы хемоаттрактантов, в том, что они подвержены быстрой гомологичной десенситизации в ответ на стимуляцию агонистами. Гомологичная десенситизация осуществляется за счет фосфорилирования активированного рецептора внутриклеточной киназой (GRK) и последующим присоединением белка бета-аррестина к сайту фосфорилирования, что ведет к инактивации рецептора. Независимо от способности к выключению сигнализации GPCR, бета-аррестины могут сами напрямую активировать последующие сигнальные пути для тонкой регуляции двигательной активности клеток [21]. Кроме того, при взаимодействии хемокинов и атипичных рецепторов ACKR, которые не ассоциированы с G-белками, сигнализация обычно идет по бета-аррестин-зависимому пути. Более того, возможна гетерологичная десенситизация при активации рецепторов хемоаттрактантов различных семейств: например, была показана реципрокная десенситизация кальциевого ответа, полимеризация актина и миграция при стимуляции fMLF и компонентом комплемента C5a [22]. Предварительная стимуляция любым из этих хемоаттрактантов вызывала де-

сенситизацию к другим хемокинам, например, ингибируя ответы нейтрофилов на CXCL1 и CXCL8. В эксперименте на мышах показано, что непептидный агонист FPR приводил к подавлению экспрессии CXCR2 в нейтрофилах и неспособности к кальциевой мобилизации и хемотаксису в ответ на C5a, LTB4 или CXCL1 [23]. Активация PAFR реактивирует десенситизированные FPR актин-зависимым способом, что приводит к усиленной продукции АФК [24]. Было показано, что при активации PAFR сигналы от субъединицы $G\alpha_q$ критичны для активации $G\alpha_i$ -сцепленных рецепторов FPR [25]. Обобщенная схема вероятных внутриклеточных сигнальных путей рецепторов хемоаттрактантов представлена на рис. 4.

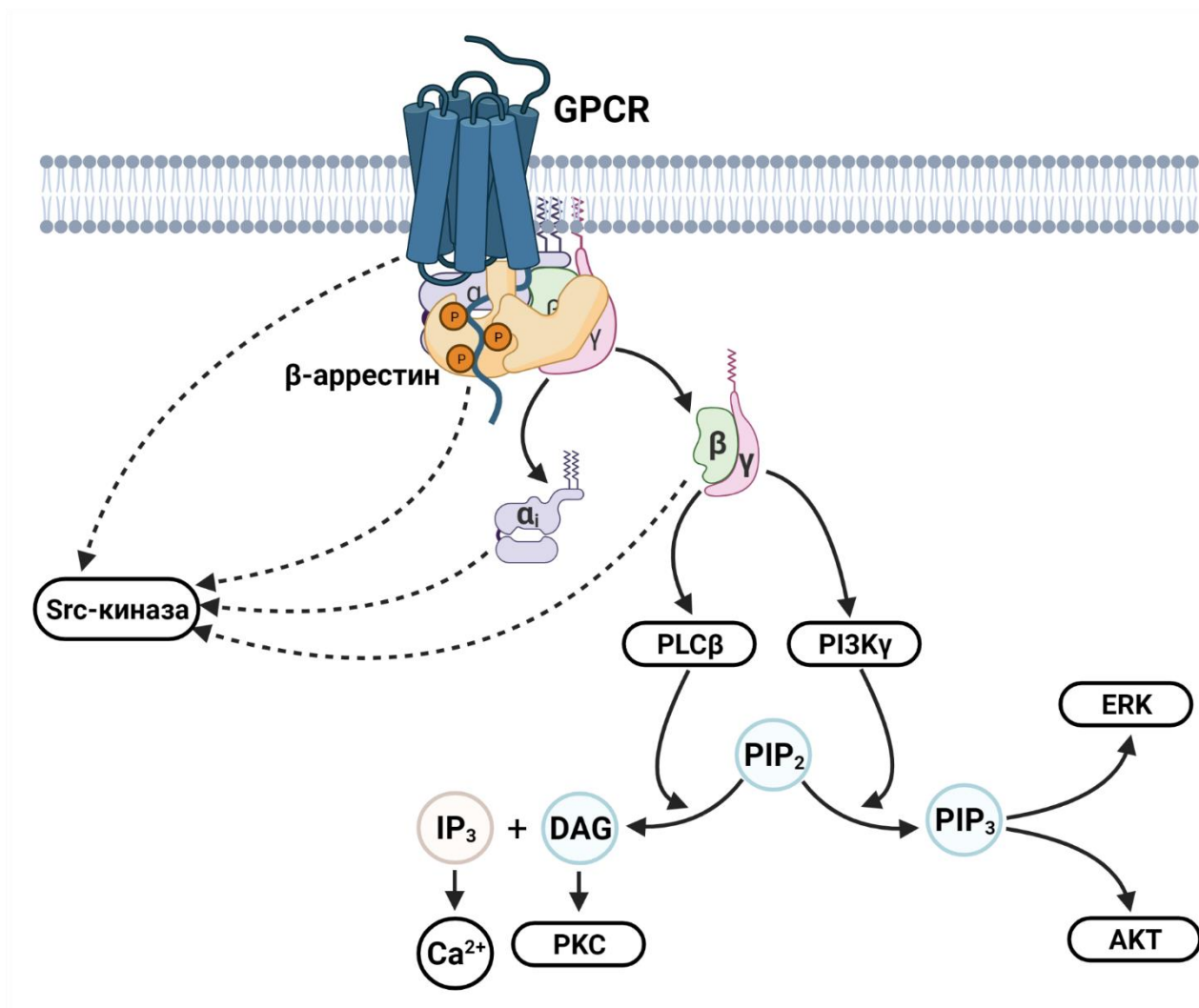


Рис. 4. Схема сигнальных путей хемотаксических рецепторов

В активации двигательных функций клетки важную роль играют механизмы гидролиза и фосфорилирования фосфоинозитидов, а

также каскады серин/треонинового и тирозинового фосфорилирования белков. PLC гидролизует фосфоинозитолы до DAG и PIP₂, которые, в свою очередь, активируют протеинкиназу C и запускают высвобождение кальция из внутриклеточных депо. PI3K фосфорилирует фосфоинозитолы по третьему положению в инозитольном кольце до PIP₃, который затем взаимодействует с плекстриновыми (PH и PX) доменами белков, тем самым активируя их. Также было показано, что при стимуляции рецепторов хемоаттрактантов наблюдается активация киназ семейства Src.

Вопросы для самоконтроля:

1. Что такое хемотаксис?
2. Что запускает реакцию хемотаксиса?
3. Какие виды хемоаттрактантов различают?
4. Какие рецепторы хемоаттрактантов известны?
5. Какая основная особенность рецепторов, относящихся к классу GPCRs?
6. В чем заключается принцип иерархии рецепторов хемоаттрактантов?
7. Каковы основные сигнальные пути рецептор-опосредованной активации хемотаксиса?

1.2. Фагоцитоз

Функционально нейтрофилы относятся к фагоцитам, т.е. клеткам, которые способны к захвату чужеродных частиц и собственных апоптотических клеток. Фагоцитоз необходим для поддержания гомеостаза тканей и для реализации ответов врожденного иммунитета. Фагоцитозом считается захват частиц диаметром более 0.5 мкм в окруженную мембраной вакуоль. К фагоцитозу способны также макрофаги и дендритные клетки. Большинство механизмов фагоцитоза были изучены на макрофагах, меньше известно о фагоцитозе нейтрофилов, в основном из-за того, что это короткоживущие клетки, которые трудно поддаются генетическим модификациям.

1.2.1. Фагоцитоз опсонизированных частиц

Опсонины – антитела и факторы системы комплемента, способные адсорбироваться на поверхности антигена, они распознаются иммунными клетками и усиливают фагоцитоз. В зависимости от природы частиц процесс фагоцитоза может сильно различаться, следовательно, различаются механизмы и сигнальные пути активации.

При изучении механизмов фагоцитоза для опсонизации частиц довольно часто используют иммуноглобулины G (IgG) или компоненты комплемента. Для интернализации опсонизированных IgG частиц требуется расширение мембраны, привлечение тирозиновой киназы Syk и продукция провоспалительных медиаторов, в то время как захват опсонизированной комплементом частицы происходит как погружение/потопление частицы в клетку и не сопровождается продукцией провоспалительных медиаторов. При фагоцитозе патогенов можно наблюдать оба процесса [26].

Fc-рецепторы (FcR) нейтрофилов участвуют в распознавании патогенов, опсонизированных иммуноглобулинами G и иммунными комплексами. Нейтрофилы человека экспрессируют высокоаффинный рецептор FcγRI и низкоаффинные FcγRIIA и FcγRIII (A и B, CD16), которые содержат ITAM мотивы в своем внутриклеточном домене (англ. Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif). ITAM представляет собой специфическую последовательность аминокислот YxxL/Ix(6-12)YxxL/I, где x – это любая аминокислота.

FcγRIIA и FcγRIIIB необходимы при активации нейтрофилов человека иммунными комплексами [27, 28]. FcγRIIA является одноцепочечным трансмембранным белком. Димеризация FcγRIIA ведет к фосфорилированию ITAM, что вызывает активацию тирозиновых киназ Syk, которые запускают дальнейшую сигнализацию [29]. FcγRIIIB – полностью внеклеточная молекула, «заякоренная» в плазматической мембране посредством GPI мотива. FcγRI экспрессируются нейтрофилами в ответ на стимуляцию цитокинами IFN-γ или G-CSF, покоящиеся нейтрофилы не имеют этих рецепторов.

Другой класс рецепторов содержит мотив ITIM (англ. Immunore-

ceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif), который привлекает фосфатазы, ингибирующие передачу сигнала. К таким рецепторам относится FcγRIIB [26, 30].

Белки комплемента активируются через Ig-зависимые и Ig-независимые механизмы. Частицы, опсонизированные компонентами комплемента, узнаются и захватываются специфическими рецепторами комплемента: рецептор комплемента 1 (CR1), рецептор комплемента 3 (CR3, αMβ2 integrin, CD11b/CD18, или Mac-1) и рецептор комплемента 4 (CR4, αXβ2 integrin, CD11c/CD18, или gp150/95). Нейтрофилы экспрессируют все три рецептора. CR1 может связывать компоненты комплемента C1q, C3b, C4b, а также маннан-связывающий лектин (англ. mannan-binding lectin, MBL), но в одиночку он не может обеспечить захват частицы без дополнительных сигналов. Интегрин αMβ2 и CR4 связывают iC3b-опсонизированные частицы [26]. αMβ2 может опосредовать фагоцитоз опсонизированных и неопсонизированных частиц, но при этом нуждается в дополнительных сигналах как хемокины, цитокины (ФНО-альфа) и микробные продукты (ЛПС).

1.2.2. Фагоцитоз неопсонизированных частиц

Фагоцитоз неопсонизированных частиц запускается за счет прямого узнавания мишени. Патогены экспрессируют молекулы, необходимые для их собственного внедрения и выживания (патогенности) в организме, PAMP. Эти молекулы узнаются специфическими паттерн-распознающими рецепторами на поверхности клетки, PRR (англ. Pathogen Recognition Receptors). Примерами таких патоген-ассоциированных молекул являются бета-глюканы, маннаны и хитины, входящие в состав клеточной стенки грибов. Нейтрофилы экспрессируют на поверхности рецепторы для распознавания PAMP: лектиновый рецептор С типа (CLR) и Толл-подобные рецепторы (TLR). CLR нейтрофилов (Dectin-1, Dectin-2 и Mincle) узнают бета-глюканы и альфа-маннозу [31]. Зимозан является частицей клеточной

стенки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и состоит, в основном, из альфа-маннозы и бета-глюканов; макрофаги и нейтрофилы человека способны к Dectin-1-опосредованному фагоцитозу неопсонизированных частиц зимозана [32, 33].

Вопросы для самоконтроля:

1. Что такое фагоцитоз?
2. Что такое опсонины?
3. Какие рецепторы отвечают за фагоцитоз опсонизированных частиц?
4. Какие рецепторы обеспечивают фагоцитоз неопсонизированных частиц?

1.3. Респираторный взрыв

1.3.1. Активные формы кислорода

Важным защитным механизмом в арсенале нейтрофилов является продукция активных форм кислорода (АФК). Процесс сопровождается бурным потреблением энергии АТФ и молекулярного кислорода, вследствие чего этот процесс также получил название респираторного взрыва. Нейтрофилы способны синтезировать супероксид-анион ($\cdot\text{O}_2^-$) в ответ на стимуляцию различными частицами (фагоцитоз-активированная продукция АФК) или растворимыми воспалительными стимулами такими, как fMLF, иономицин и ЛПС. Супероксид-анион является предшественником других АФК (рис. 5).

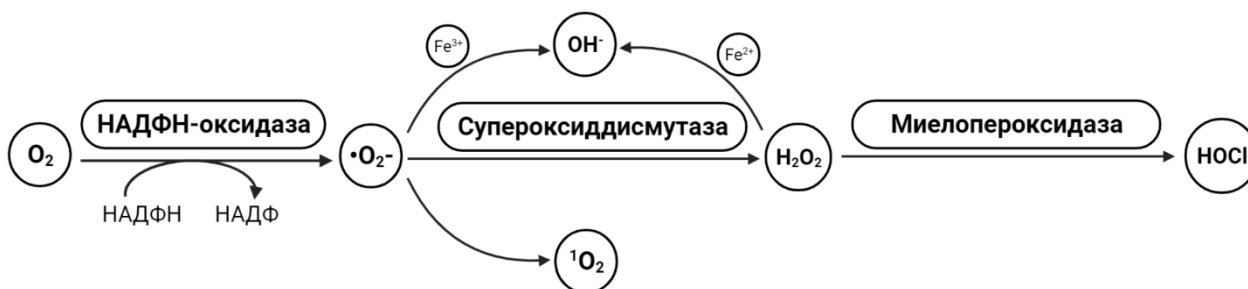


Рис. 5. Продукция активных форм кислорода
(по [34] с изменениями)

Основным ферментом, катализирующим продукцию АФК фагоцитами, является НАДФН-оксидаза. Мембранный комплекс НАДФН-оксидазы продуцирует супероксид анион, который дисмутирует в перекись водорода (H_2O_2) под действие фермента супероксиддисмутазы (СОД), превращается в гидроксил радикал ($OH\cdot$) в присутствии ионов железа в реакции Фентона или в синглетный кислород (1O_2). Миелопероксидаза (МПО) превращает перекись водорода в гипохлорит анион ($HOCl$).

АФК играют важную роль в защите организма от бактерий, вирусов и грибов и в процессах воспаления. Их недостаток позволяет бактериям выживать и колонизировать органы и ткани, что приводит к затяжным повторяющимся бактериальным инфекциям и сепсису. Нерегулируемая продукция АФК ведет к окислительному стрессу и способствует хроническому воспалению.

Нейтрофилы высвобождают большие количества АФК в очаге инфекции вследствие активации поверхностных рецепторов. Связывание лигандов GPCR, TLR, рецепторов цитокинов могут праймировать нейтрофилы на более мощный ответ при последующей стимуляции. В зависимости от концентрации бактериального пептида fMLF его связывание с FPR может вызывать либо праймирование клеток, либо продукцию АФК [15]. Активация сигнальных путей, приводит к активации эффекторных белков, сборке компонентов НАДФН-оксидазы и продукции АФК. В свою очередь, АФК могут активировать выброс протеаз и образование нейтрофильных внеклеточных ловушек. Кроме того, некоторые АФК могут проникать через мембрану бактерий и повреждать её и внутриклеточные компоненты. Некоторые патогены эволюционно приспособились противостоять/предупреждать респираторный взрыв фагоцитов за счет секреции специфических ингибиторов или токсинов, которые препятствуют сборке комплекса НАДФН-оксидазы либо подавляют сигнальные пути активации.

Таким образом, кислород-зависимые иммунные механизмы эффективно устраняют патоген, но при этом могут вызвать локальные

или обширные долгосрочные повреждения. Обширные повреждения могут привести к поражению ткани, нейродегенеративным процессам, старению, канцерогенезу. Кроме того, неконтролируемая противомикробная активность нейтрофилов может послужить пусковым механизмом тяжелых воспалительных и аутоиммунных заболеваний, таких как системная красная волчанка, ревматоидный артрит и сахарный диабет первого типа [11].

1.3.2. Структура НАДФН-оксидазного комплекса

В ответ на активацию клетки провоспалительными медиаторами (бактериальные компоненты, объекты фагоцитоза, лиганды PRR) происходит активация и сборка компонентов НАДФН-оксидазы. Оксидаза фагоцитов (англ. **phagocyte oxidase**, *phox*) состоит из пяти субъединиц: *gp91phox*, *p22phox*, *p40phox*, *p47phox*, и *p67phox* [35].

В покоящейся клетке субъединицы *gp91phox* и *p22phox* образуют гетеродимерную субъединицу, флавоцитохром b558, которая составляет каталитический центр НАДФН-оксидазы. Цитохром b558 находится в мембранах клеток: мембране фагосом, секреторных везикул, специфических гранул и плазматической мембране. Субъединица *gp91phox* является электронтрансферазой, её цитозольный домен принимает электроны от молекулы НАДФН и переносит через мембрану на молекулу кислорода с образованием супероксид аниона.

У млекопитающих было выявлено семь белков семейства NOX-изоформ *gp91phox* (NOX2): NOX1-5, DUOX1 и DUOX2. Все белки NOX имеют шесть трансмембранных доменов, участки связывания НАДФ и ФАД и консервативные спаренные гистидины для связывания с гемовыми группами [36].

Субъединица *gp91phox* (или β субъединица цитохрома b558) кодируется геном *CYBB*, который находится на X-хромосоме в локусе 21.1. Субъединица *gp91phox* синтезируется как белок с молекулярной массой 58 кДа, который затем гликозилируется с образованием белка с массой 65 кДа в эндоплазматическом ретикулуме. Этот белок связывается с гемом и образует гетеродимер с белком *p22phox*. Гетеро-

димер переносится к аппарату Гольджи, где он гликозилируется до зрелого белка с массой 91 кДа, имеющего три сайта гликозилирования аспарагина: Asn132, Asn149, Asn240 [37, 38]. Белок *gp91phox* состоит из 570 аминокислот, 300 аминокислот в *N*-конце образуют шесть трансмембранных альфа-спиралей, цитозольный *C*-концевой домен содержит сайты связывания для ФАД и НАДФН и парные гистидины для связывания гема. Электроны переносятся от НАДФН к ФАД, а затем на гем для восстановления кислорода до супероксид аниона.

Было показано, что в активированных нейтрофилах субъединица *gp91phox* фосфорилируется протеинкиназой *C*, и это фосфорилирование повышает диафоразную активность (т.е. катализ восстановления НАДФН) цитозольного домена флавопротеина *gp91phox* и его связывание с белками *Rac2*, *p67phox*, and *p47phox* [39].

Белок *p22phox* (α -субъединица цитохрома *b558*) кодируется геном *СУВА*, который находится в локусе 16q24. Субъединица *p22phox* состоит из 195 аминокислот, образуя белок с молекулярным весом в 22 кДа. *P22phox* связывается с белком *gp91phox* и вносит вклад в его созревание и стабилизацию. *N*-концевая область белка *p22phox* содержит, по крайней мере, две альфа-спирали; *C*-концевой цитоплазматический домен лишен какой-либо специфической структуры, за исключением пролин-обогащенного участка с мотивом *RxxP* (*PRR* домен, где *x* – это любая аминокислота). Этот мотив может связывать *SH3* домены (*Src* homology 3) белка *p47phox* [37, 40]. Фосфорилирование протеинкиназой *C* аминокислоты *Thr147*, которая расположена близко к пролин-обогащенному участку, усиливает активность НАДФН оксидазы и регулирует взаимодействие белков *p22phox* и *p47phox* на мембране [41]. Субъединица *p22phox* действует как место посадки регуляторного тримерного комплекса за счет взаимодействия с субъединицей *p47phox*. В покоящихся клетках регуляторный комплекс, состоящий из субъединиц *p40phox*, *p47phox* и *p67phox*, находится в цитозоле. Такое разделение компонентов на две группы и их распределение между разными клеточными регионами предотвраща-

ет спонтанную активацию оксидазы и потенциальное повреждение покоящейся клетки. Более того, такое разделение обеспечивает множество точек регуляции продукции АФК. В ответ на активацию цитозольные компоненты перемещаются к мембране и взаимодействуют с мембранными компонентами, запуская перенос электронов.

В дополнение к специфичным компонентам при сборке оксидозного комплекса привлекается белок Rac2. Rac2 принадлежит к семейству малых ГТФаз Rho. Он не активен, когда связан с ГДФ, и активируется при связывании с ГТФ. Факторы обмена гуанинового нуклеотида (GEF) ускоряют высвобождение ГДФ и позволяют белку связаться с молекулой ГТФ. ГТФаза-активирующий белок (GAP) повышает скорость гидролиза ГДФ и подавляет сигнализацию ГТФазы. Ингибиторы диссоциации гуаниновых нуклеотидов (GDI) удерживают ГДФ-связанные формы некоторых ГТФаз в цитозоле, тем самым предотвращают их перемещение к мембране и активацию.

Известны две изоформы белка Rac: Rac1 и Rac2. Оба белка состоят из 192 аминокислот и имеют 92% гомологию. Rac1 экспрессируется практически во всех тканях, тогда как Rac2 только в гемопоэтических клетках и их потомках. Rac1 и Rac2 подвергаются геранилгеранилированию на С-концевом участке, благодаря чему усиливается их взаимодействие с мембранами. В покоящемся состоянии белки находятся в цитозоле вследствие взаимодействия с RhoGDI [37, 42].

Белок *p40phox* кодируется геном NCF4, который расположен в локусе 22q13.1. Белок состоит из 339 аминокислот, его молекулярный вес 39 кДа. Функциональные домены *p40phox* включают PX (англ. Phox homology), SH3 и PB1 (англ. Phox and Bem1) домены (рис. 6). *p40phox* усиливает привлечение белков *p67phox* и *p47phox* к мембране в ответ на стимуляцию фторболовым эфиром. Более того, считается, что *p40phox* играет ключевую роль в сборке оксидазы на мембране фагосомы [43-46].

Взаимодействие белков *p40phox* и *p67phox* происходит посредством их PB1 доменов с формированием очень плотного комплекса [37]. SH3 домен белка *p40phox* взаимодействует с PRR доменом С-

концевого участка белка *p47phox*, но это взаимодействие очень слабое по сравнению с взаимодействием между *p47phox* и *p67phox* [47]. PX домен специфически связывается с фосфоинозитами.

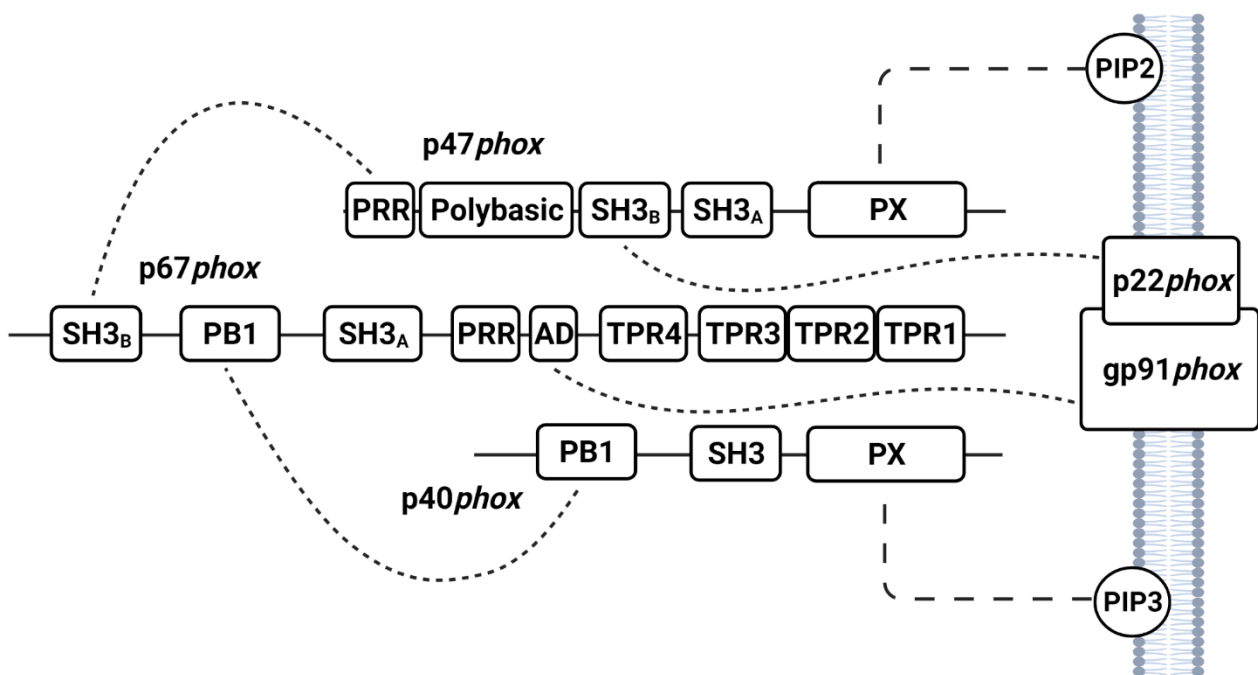


Рис. 6. Структура и взаимодействие компонентов НАДФН оксидазы (по [45] с изменениями)

Белок *p47phox* кодируется геном *NCF1*, который локализован в локусе 7q11.23. Белок *p47phox* состоит из 390 аминокислот, его молекулярный вес составляет 44,7 кДа. В своем составе он содержит PX домен, два близко находящихся SH3 домена (SH3A и SH3B), полиосновную область (PBR, polybasic), богатую агринином и лизином, и, по крайней мере, один PRR домен (рис. 6). Пролин-обогащенный участок PRR белка *p47phox* взаимодействует со вторым SH3 доменом белка *p67phox* (*p67phox*-SH3B) [37, 48].

В покое оба SH3 домена внутри одной молекулы взаимодействуют с C-концевой областью нефосфорилированного белка *p47phox* (так называемой авто-ингибиторной областью), а SH3B домен взаимодействует с PX доменом [49]. Полагают, что во время активации эти регионы раскрываются. Это позволяет PX домену связываться с мембранными анионными фосфолипидами, и два SH3 домена белка *p47phox* взаимодействуют с C-концевой областью белка

p22 $phox$. Для «освобождения» белка p47 $phox$ от самоингибирования и его перемещения к мембране необходимо множественное фосфорилирование. Как было показано, у больных хронической грануломатозной болезнью, у которых отсутствует функциональный белок p47 $phox$, имеются нарушения в сборке оксидазного комплекса, Rac2 не перемещается к мембране, белок p67 $phox$, не достаточно связывается с белками цитоскелета [50]. Для p47 $phox$ было выявлено одиннадцать сайтов фосфорилирования серина 303, 304, 310, 315, 320, 328, 345, 348, 359, 370 и 379. Сериновые остатки 303, 304, 310, 315, 320 и 328 находятся в PBR домене и потому являются частью самоингибирующего сегмента. Наиболее важными для активации оксидазы являются серины 303, 304 и 328 [37]. Достаточно одной мутации с заменой серина в положении 379 на аланин, чтобы полностью предотвратить перемещение к мембране и ингибировать активацию НАДФН оксидазы. Мутации с заменой серина на аланин по положениям 303 либо 304, либо 328, либо 359, либо 370 подавляют активность НАДФН-оксидазы на 50%, в то время как мутации с заменой серина на аланин по положениям 315, либо 320, либо 348 не оказывают никакого эффекта [48]. Внесение двойных мутаций показало, что для активации НАДФН оксидазы необходимо фосфорилирование спаренных серинов 303 + 304 и 359 + 370. *In vitro* p47 $phox$ может быть фосфорилирован различными киназами: PKC α , β , δ , и ζ ; PKA; MAPK ERK2 и p38MAPK; SKI; AKT; IRAK-4; PAK и Src киназы (по обз. [48]). *In vivo* в фосфорилировании p47 $phox$ также могут участвовать очень многие киназы: PKC α , β и δ ; ERK1/2; AKT; PAK. Провоспалительные цитокины GM-CSF и ФНО- α вызывают частичное фосфорилирование белка p47 $phox$ по серину 345 через киназы ERK1/2 или p38MAPK, запуская сборку, но не активацию НАДФН-оксидазы. Фосфорилирование p47 $phox$ киназами PKC, PAK и AKT также оказывает стимуляторный эффект на активацию НАДФН оксидазы [48], тогда как фосфорилирование p47 $phox$ киназами PKA или SKI может иметь подавляющий эффект.

Белок p67 $phox$ кодируется геном NCF2, который расположен в

локусе 1q25. Белок *p67phox* состоит из 526 аминокислот, молекулярный вес составляет 59,8 кДа. Он содержит четыре тетратрикопептид-содержащих домена (tetratricopeptide repeat-containing domain, TPR), PRR и два SH3 домена, которые разделены PB1 доменом (рис. 13). Белок *p67phox* способен в одиночку усилить ток электронов от НАДФН к флавин-содержащему центру НАДФН оксидазы [51].

Белок Rac связывается с TPR областью белка *p67phox*, который имеет одинаковое сродство к Rac1 и Rac2 [52]. Аминокислотные остатки Ala27 и Gly30 белка Rac важны как для взаимодействия с *p67phox* и формирования комплекса *p67phox*-Rac, так и для активации НАДФН-оксидазы. Мутации с заменой обеих аминокислот в Rac белке ведут к полной неспособности связывания с *p67phox* и активации оксидазы. Первый SH3 домен белка *p67phox* (*p67phox*-SH3A) повышает сродство белка к оксидазному комплексу [53]. Белок *p67phox* способен связываться с триадой Cys-Gly-Cys в дегидрогеназной области белка *gp91phox* [54]. Cys-Gly-Cys отсутствует в других белках Nox, поэтому *p67phox*-SH3A не участвуют в активации Nox1 и Nox3 [53], позволяя предположить, что *p67phox* играет специфическую роль в активации *gp91phox*.

В покоящейся клетке белки *p40phox*, *p47phox* и *p67phox* находятся в цитозоле в виде комплекса и связаны в стехиометрическом соотношении 1:1:1. После стимуляции белок *p47phox* фосфорилируется, и затем цитозольный комплекс *p40phox*-*p47phox*-*p67phox* перемещается к мембране, взаимодействует с субъединицами *gp91phox* и *p22phox* с образованием активной НАДФН-оксидазы. Для активации также необходимы Rac ГТФазы; при активации Rac связывается с молекулой ГТФ и перемещается к мембране наряду с цитозольным комплексом [37, 42].

Самые сложные вопросы возникают по поводу взаимодействий между субъединицами и их динамики. Так, было показано, что субъединица *p67phox* остается в мембране фагосом до конца продукции АФК [55]. Li и соавторы [56] показали, что через несколько минут после замыкания фагосомы пропадает связь между субъединицами

p67phox и *p47phox*. Faure и соавторы [57] показали, что белки *p47phox* и *Rac2* временно аккумулируются у мембраны фагосом и диссоциируют от мембраны до окончания продукции АФК. Таким образом, взаимодействия *Rac-p67phox* и *p67phox-p47phox* важны для активации НАДФН-оксидазы, но динамика активации оксидазы на мембране фагосом и плазматической мембране могут различаться. Здесь важную роль могут играть белки цитоскелета, актин усиливает перемещение цитозольных компонентов. Было показано, что белки *p67phox*, *p40phox*, *Rac2* ассоциированы с актиновым цитоскелетом как в покоящихся, так и в активированных нейтрофилах. Белок *p47phox* связан с актином цитоскелета в покоящихся клетках, что происходит с этой связью при активации нейтрофилов до сих пор остается спорным вопросом [48, 58, 59]. Недавние исследования подтверждают, что белки *p47phox*, *Rac1* и в меньшей степени *Rac2*, но не *p67phox*, напрямую связываются с альфа- и бета-актином [60, 61]. Кроме того, было обнаружено, что субъединица *p40phox* может прямо связываться с F-актином посредством PX домена [62]. Компоненты НАДФН-оксидазы могут также взаимодействовать с актином опосредованно через актин-связывающие белки, такие как *WAVE1*, *моэзин* и *кортактин* [59].

1.3.3. АФК и иммунитет

Активные формы кислорода, которые продуцирует НАДФН-оксидаза, играют важную роль в уничтожении патогенов. Приблизительная оценка концентрации АФК в фагосоме составила 25 мкМ для O_2^- и 2 мкМ для H_2O_2 [63]. Любопытно, что разные бактерии по-разному отвечают на воздействие перекисью, в связи с чем возникает вопрос, как клетка решает сколько и какого типа АФК нужны для уничтожения патогенов.

По сравнению с O_2^- и H_2O_2 , $HOCl$ является более мощным окислителем. Образование $HOCl$ - из перекиси водорода и ионов хлора катализируется ферментом миелопероксидазой (МРО). $HOCl$ крайне цитотоксичен и бактерициден, например, стафилококки уничтожаются внутри фагосом в основном только за счет $HOCl$ [64].

Хроническая грануломатозная болезнь (ХГБ) – редкое генетическое нарушение, вызванное мутацией в гене одной из субъединиц НАДФН-оксидазного комплекса. Приблизительная частота случаев заболевания составляет 1:200 000. При этом хроническая грануломатозная болезнь является наиболее частым клиническим нарушением функционирования нейтрофилов [65]. Около 70 % всех грануломатозных нарушений возникают вследствие связанного с X-хромосомой рецессивного дефекта в гене, кодирующем белок *gp91phox*, аутосомно-рецессивные мутации *p47phox* являются причиной 25-30 % случаев ХГБ. До 10 % случаев болезни связано с дефектами генов *p22phox* и *p67phox* [65-68].

Для больных ХГБ с раннего детства и подросткового возраста, характерны повторяющиеся инфекции, особенно инфицирование грибами рода *Aspergillus* и каталаза-положительными бактериями (*Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia*, *Serratia marcescens* и *Nocardia spp.*) [65, 69]. Нейтрофилы со сниженным количеством функциональных белков *p47phox* по-прежнему могут продуцировать небольшое количество АФК [70], в то время как у пациентов с нарушениями *gp91phox*, *p22phox* или *p67phox* наблюдаются более тяжелые клинические проявления [71]. На мышинной модели было показано, нокаут по *СУВВ* приводит к повышенному высвобождению ИЛ-1 α и G-CSF при поражении тканей; затем высокий уровень цитокинов приводит к гипервоспалению. Авторы предполагают, что нормальная продукция АФК может даже уменьшать воспаление за счет снижения секреции цитокинов через модуляцию транскрипционного фактора NF- κ B, который контролирует транскрипцию ДНК, продукцию цитокинов и выживание клетки [72].

Патогены со своей стороны вырабатывают способы противостояния защитным механизмам организма и выживания внутри клеток организма. Микроорганизмы могут нарушать сборку и активацию НАДФН-оксидазы. Человеческий гранулоцитарный анаплазмоз – клещевая риккетсиозная инфекция, вызываемая *Anaplasma phagocytophilum* [73]. Инфицированные *A. phagocytophilum* нейтрофилы и

HL-60 теряют способность продуцировать АФК вследствие подавления транскрипции белков *gp91phox* и *Rac2* [74] и снижения уровня белка *p22phox* [75]. Еще одно заболевание – туляремия, мультисистемная чума, вызванная *Fransicella tularensis*, которая, будучи заключенной в фагосому, может удалить флавоцитохром b558 из мембраны [76]. *Helicobacter pylori*, известная грамотрицательная бактерия, которая вызывает гастрит и инфекции желудка, иногда приводящие к язвенной болезни или даже раку, нарушает нацеливание НАДФН-оксидазы, и её компоненты собираются на плазматической, а не фагосомальной мембране; в результате супероксид анионы выбрасываются из клетки, не накапливаясь внутри фагосомы. Сформированные фагосомы с *Helicobacter* содержат b558, но не могут эффективно привлекать и связывать белки *p47phox* или *p67phox* [77].

1.3.4. Окислительный стресс и регуляция продукции АФК

НАДФН-оксидаза фагоцитов может действовать и на собственный организм. Избыточная или неуместная продукция АФК вносит свой вклад в развитие широкого спектра патологий, таких как травма, инфаркт миокарда, ишемический инсульт, некоторые типы гематологических и респираторных заболеваний. Излишняя выработка АФК может усугубить осложнения, связанные с сердечной реперфузией [78]. Излишняя продукция АФК также оказывает нейротоксичное действие, вызывая нейродегенерации. Увеличение выработки АФК и/или снижения уровня антиоксидантной способности клеток способствует развитию нейродегенеративных заболеваний, например, болезни Паркинсона и Альцгеймера [79].

Одним из механизмов избыточной продукции АФК является сверхэкспрессия НАДФН-оксидазы. Это может происходить на уровне транскрипции, пост-транскрипционном уровне и даже на уровне трансляции. Транскрипция белка *gp91phox* регулируется через сигнальный путь ИФН- γ /JAK-STAT. Промоторная область гена *gp91phox* содержит последовательность сайта связывания (так называемая γ -активируемая последовательность) STAT1, который служит

посредником в запуске транскрипции гена *gp91phox*, вызванной интерфероном- γ . Промоторные области генов *Nox1*, *Nox4*, *p22phox*, *p47phox*, и *p67phox* также содержат γ -активируемую последовательность, которая может быть ответственна за усиление транскрипции этих генов. Кроме того, гены белков *Nox1*, *p22phox*, *NOXO1*, и *p67phox* содержат сайты связывания белка AP-1, который является транскрипционным фактором, регулирующим экспрессию генов в ответ на многие стимулы, включая цитокины, ростовые факторы, стресс и микробные инфекции [80, 81].

Как говорилось выше, фосфорилирование компонентов НАДФН-оксидазы является необходимым шагом в ее активации. Повышение концентрации внутриклеточного цитоплазматического кальция также действует как сигнал к активации НАДФН-оксидазы. Известно, что кальций стимулирует активность оксидазы за счет усиления слияния гранул, активации протеинкиназы C и других опосредованных эффектов [45]. Процессы повышения концентрации кальция, фосфорилирование и другие внутриклеточные реакции запускаются в ответ на активацию рецепторов и контролируют привлечение регуляторных компонентов к мембранам для активации НАДФН-оксидазного комплекса [39, 48, 82-84]. После связывания рецептора сборка НАДФН-оксидазы может быть запущена одновременно двумя событиями: во-первых, активацией белка *Rac2* путем замены ГДФ на ГТФ и/или Ca^{2+} /PKC-зависимым путем, во-вторых, фосфорилированием белка *p47phox* по сериновым остаткам [35, 45]. Таким образом, белок *Rac2* и фосфорилированный комплекс белков *p47phox*-*p40phox*-*p67phox* одновременно, но независимо друг от друга, движутся к мембране и взаимодействуют с цитохромом b558, образуя НАДФН-оксидазный комплекс [85, 86]. Как только оксидазный комплекс собирается, он начинает перенос электронов от цитозольного НАДФН к внеклеточному кислороду, генерируя супероксид анионы.

Вопросы для самоконтроля:

1. Что такое респираторный взрыв?
2. Опишите типы АФК и их происхождение.
3. Структура ферментного комплекса НАДФН-оксидазы.
4. Какие функциональные домены субъединиц оксидазы обеспечивают их сборку на мембране, взаимодействие друг с другом и активацию?
5. Какая химическая модификация субъединиц является критической в активации НАДФН-оксидазы?
6. Какие механизмы используют бактерии, чтобы противостоять оксидантной активности фагоцитов?
7. Что может активировать респираторный взрыв фагоцитов?

1.4. Секреторная дегрануляция

Нейтрофилы могут уничтожать патогены различными путями, включая фагоцитоз или формирование внеклеточных нитей. Эти процессы происходят при участии нейтрофильных гранул, в которых содержится множество противомикробных белков и протеолитических ферментов.

1.4.1. Гранулы нейтрофилов

Нейтрофилы содержат три основных типа гранул: первичные азурофильные гранулы, вторичные специфические и третичные желатиновые гранулы.

Азурофильные гранулы нейтрофилов образуются при созревании в костном мозге и содержат миелопероксидазу, нейтральные протеазы (эластаза, катепсин G, протеиназа 3 и азуроцидин), микробицидные белки: лизоцим, дефенсины и белки, усиливающие пермеабиллизацию бактерий (англ. bacterial permeability-increasing proteins).

Большая часть гранул нейтрофилов представлена специфическими вторичными гранулами. По содержанию и по функции специфические гранулы перекрываются с желатиновыми гранулами, но их

можно различить по наличию лактоферрина (специфические гранулы) и металлопротеиназы-9 (желатиназные гранулы). Белки в обоих типах гранул важны для разрушения внеклеточного матрикса, выхода нейтрофилов из кровеносного русла и миграции. Секреторные везикулы обеспечивают дополнительный набор белков, усиливающих выход из кровеносного русла: рецепторы формилпептидов (англ. *formyl peptide receptors, FPR*), рецепторы хемокинов (англ. *chemokine receptors, CXCR*), CD16, Mac-1 и рецепторы компонентов комплемента. Секреторные везикулы содержат сывороточный альбумин человека, поглощенный в процессе эндоцитоза [87, 88]. И, наконец, фиколин-обогащенные гранулы содержат большое количество фиколина-1 (*ficolin-1*), микроб-связывающего лектина, имеющего структурную гомологию с белком комплемента C1q, за счет чего происходит активация каскада комплемента при взаимодействии с микробами [89].

Азурофильные пероксидаза-позитивные гранулы содержат миелопероксидазу, сериновые протеазы 3 (PR3), нейтрофильные эластазы (NE), катепсин G (CG), дефенсины и др. [90, 91]. Вторичные и третичные гранулы не содержат пероксидазу. Вторичные гранулы содержат широкий спектр противомикробных соединений, таких как лактоферрин, нейтрофильный липокаин, ассоциированный с желатиназой (NGAL), hCAP-18 и лизоцим [92]. Третичные гранулы меньше по размеру, чем вторичные, и гораздо легче высвобождаются по сравнению с вторичными. Кроме этих гранул, нейтрофилы также имеют в своем арсенале секреторные везикулы, являющиеся резервуарами для мембран-ассоциированных рецепторов, которые могут утилизироваться по мере необходимости в воспалительном ответе клеток. Мембрана секреторных везикул богата такими белками как $\alpha M\beta 2$ интегрин, рецептор комплемента 1 (CR1), рецепторы формилированных пептидов (FPR), рецептор липополисахарида и липотейхоевой кислоты (CD14), Fc γ III-рецептор (CD16) и металлопротеаза лейколизин [92]. CR1 является одним из наиболее изученных маркеров секреторных везикул, он отсутствует на мембране неактивированных нейтрофилов и гранул [91]. Основные белки, ассоциирован-

ные с гранулами нейтрофилов, приведены в таблице 1.

Таблица 1

Белки нейтрофильных гранул [91]

	Белок	Первичные гранулы	Вторичные гранулы	Третичные гранулы	Секреторные везикулы
Мембранные	CD63, CD68	+	-	-	-
	CD10	-	-	-	+
	CD11b/CD18	-	++	+	+
	CD15	-	-	-	+
	CD16	-	-	-	+
	CD35	-	-	-	+
	CD66	-	+	-	-
	CD67	-	+	-	-
	CD177	-	++	+	-
	NOX2	-	++	+	+
	MMP-25	-	-	+	++
	NRAMP2	-	-	-	+
	FPR	-	-	+	-
	SCAMP	-	+	++	+++
	VAMP2	-	-	+	++
Синтаксин-4	-	-	-	-	
Матриксные	МПО	+	-	-	-
	ВРІ	+	-	-	-
	Дефенсины	+	-	-	-
	Эластаза	+	-	-	-
	Азуроцидин	+	-	-	-
	Катепсин G	+	-	-	-
	Протеиназа 3	+	-	-	-
	NSP4	+	-	-	-
	AI-at	+	+	-	++
	Лизоцим	+	++	+	-
	Аргиназа I	-	-	+	-
	B2M	-	+	-	-
	Коллагеназа	-	+	-	-
	Желатиназа	-	+	+	-
	Гаптоглобин	-	+	-	+

Белок	Первичные гранулы	Вторичные гранулы	Третичные гранулы	Секреторные везикулы
hCAP-18	-	+	-	-

Продолжение таблицы 1

Белок	Первичные гранулы	Вторичные гранулы	Третичные гранулы	Секреторные везикулы
Матриксные	Лактоферрин	-	+	-
	NGAL	-	+	-
	Фиколин I	-	-	+
	Пентраксин 3	-	+	-
	SLPI	-	+	-
	OLFM4	-	+	-
	Белки плазмы	-	-	-

После активации нейтрофилов растворимыми веществами или фагоцитируемыми частицами происходит мобилизация гранул и их слияние с плазматической мембраной или мембраной фагосом [93]. Самыми первыми высвобождаются секреторные везикулы, затем третичные гранулы, потом вторичные и первичные гранулы [92]. Все гранулы связаны с актином, но его количество различается, наименьшее количество связано с первичными гранулами [94]. Это подразумевает наличие актин-связывающего белка на мембране гранул, ответственного за процесс дегрануляции [91]. Для азурофильных гранул таким белком может быть Rac [95].

Белки семейства SNARE высококонсервативны и встречаются повсеместно, принимают участие в процессах возникновения и слияния везикул. Белки t-SNARE и синтаксин-4 присутствуют в плазматической мембране. Белки v-SNARE и VAMP2, в основном, находятся в мембране секреторных везикул, а также некоторых желатиновых и специфических гранул и отсутствуют в азурофильных гранулах [91]. Хотя доказано, что белки семейства SNARE необходимы для слияния везикул, ничего пока не известно об их взаимодействии с белками цитоскелета в регуляции секреторной дегрануляции нейтрофилов.

1.4.2. Противомикробные белки

Нейтрофилы несут множество противомикробных белков, которые действуют против грамположительных и грамотрицательных бактерий, вирусов и грибов. Различают несколько типов противомикробных белков: катионные пептиды; белки, которые связываются с мембраной бактерий, протеолитические ферменты и белки, которые лишают микроорганизмы необходимых питательных веществ [90]. К катионным противомикробным пептидам относятся дефенсины и кателицидины, а также противомикробные белки ВР1. Спектр протеолитических ферментов нейтрофилов широк: лизоцим, сериновые протеазы PR3, CG и NE, азуроцидин. Лизоцим разрушает бактериальную стенку независимо от своей ферментативной активности [96, 97]. Азуроцидин, даже не обладая протеазной активностью, способен убивать бактерии [90]. Нейтрофилы содержат хелаторы металлов, которые необходимы для жизнедеятельности микроорганизмов, например, лактоферрин ингибирует пролиферацию бактерий за счет сокращения количества железа в фагосоме [98], а кальпротектин, ингибирует рост *S. aureus* за счет захвата необходимых бактериям ионов Mn^{2+} and Zn^{2+} [99].

Вопросы для самоконтроля:

1. В чем заключается процесс секреторной дегрануляции?
2. Какие секреторные гранулы различают?
3. Каков состав нейтрофильных гранул, различия между гранулами?
4. Какие виды противомикробных белков встречаются в нейтрофилах?

1.5. Нетоз

Нейтрофилы способны уничтожать патогены за счет выброса так называемых внеклеточных нитей-ловушек (НВЛ) [12]. Выброс внеклеточных ловушек может быть стимулирован бактериями, грибами, вирусами, например, ВИЧ, и прочими патогенами [100].

Нетоз отличается от апоптоза и некроза: во время нетоза ядро разбухает, и хроматин деконденсируется, длинные нити деконденсированной ДНК, несущей различные белки, выбрасываются из клетки

во внеклеточное пространство, [12, 101]. В большинстве своем это белки гранул, в меньшей степени ядерные белки и очень небольшое количество цитозольных белков. Таким образом, белки НВЛ - это, как правило, катионные ДНК-связывающие бактерицидные белки: дефенсины, эластаза, протеиназа 3, гепарин-связывающий белок, катепсин G, лактоферрин и МПО [102].

Для образования НВЛ необходимо прикрепление нейтрофилов к субстрату, которое стимулируется интегринами $\alpha M\beta 2$ [103]. В суспензии нейтрофилов образование НВЛ идет крайне слабо, по видимому, это механизм защиты от выброса НВЛ в кровеносном русле и формирования тромбов [100]. Образование нитей зависит от уровня продукции перекиси водорода НАДФН-оксидазой и от активности МПО. Нейтрофилы пациентов с ХГБ или дефицитом МПО не способны к выбросу нейтрофильных внеклеточных ловушек [104, 105].

НВЛ, как и АФК, имеют двойственную природу: с одной стороны, они служат защитным механизмом, а с другой могут оказывать повреждающее действие. Благодаря нетозу может произойти представление собственных молекул (обычно скрытых внутри клеток) иммунной системе. Так, было показано, что НВЛ вовлечены в патогенез аутоиммунных заболеваний, таких как системная красная волчанка, когда продуцируются анти-нейтрофильные цитоплазматические антитела, в основном против МПО и PR3, или антитела против хроматина [100, 106]. Также НВЛ были обнаружены в жидкостях верхних дыхательных путей у больных муковисцидозом, они могут повышать вязкость мокроты и нарушать функционирование легких [107].

Вопросы для самоконтроля:

1. Что такое нетоз?
2. Какие условия необходимы для активации нетоза?
3. Какие белки могут входить в состав НВЛ?

ГЛАВА 2. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ГРАНУЛОЦИТОВ

Гранулоциты после созревания теряют способность к делению и активной транскрипции/трансляции и в крови живут недолго, вследствие чего очень плохо поддаются генетическим модификациям. На сегодняшний день не существует постоянной культуры нормальных нейтрофилов и методов получения долгоживущих первичных культур. Разработаны методики дифференцировки промиелобластных клеток, например, линии HL-60 в гранулоциты и макрофаги, но их применение ограничено модельными исследованиями [108]. Для изучения роли гранулоцитов в развитии заболеваний, фундаментальных и прикладных аспектов клеточной сигнализации и других процессов *in vitro* необходимы свежесодержимые жизнеспособные гранулоциты.

Наиболее часто используемый источник гранулоцитов – периферическая кровь, она наиболее доступна как при исследованиях человеческих клеток, так и клеток крупных лабораторных животных, например, кроликов и приматов. Для грызунов, конечно, сложнее получить большие объемы крови, но выделение клеток из крови крыс или мышей также возможно. Для взятия крови у кроликов обычно используют ушные вены, у грызунов – вены хвоста. Разработка методов получения генетически модифицированных мышей позволила проводить выделение и изучение функций нейтрофилов с заданными свойствами, например, моделировать мутации, приводящие к развитию патологий врожденной иммунной системы [109].

2.1. Цельная кровь как источник лейкоцитов

Лейкотромбоцитарная фракция в норме составляет не более 1% всего объема крови (рис. 7). В крови содержится $4,5-11,0 \times 10^3$ лейкоцитов/мкл, 59% составляют нейтрофилы, около 34% лимфоциты, 4% моноциты, 2,7% эозинофилы и менее 1% базофилы.

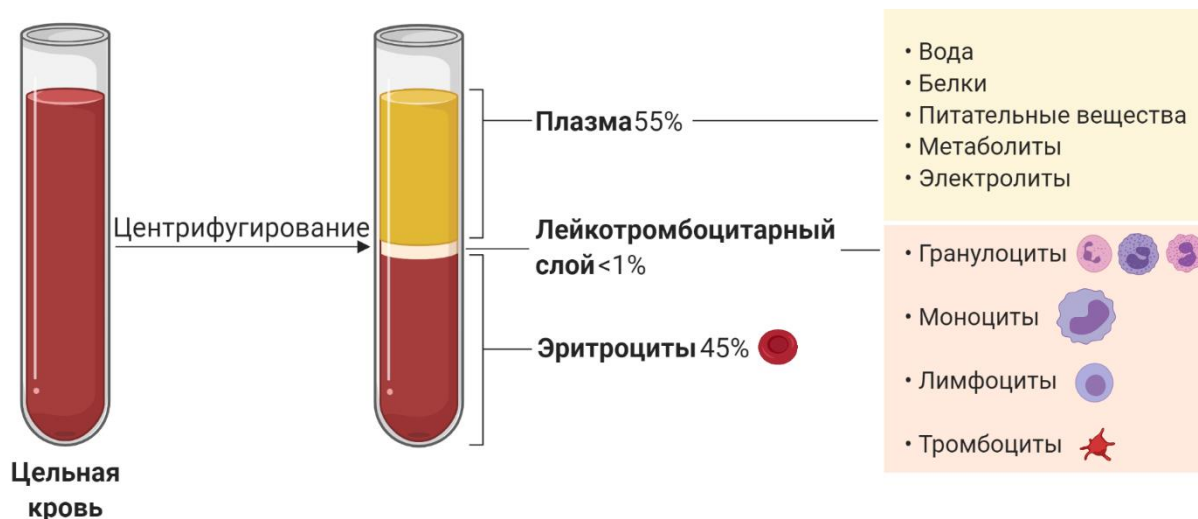


Рис. 7. Состав цельной крови

При взятии крови для выделения клеток применяются различные антикоагулянты – вещества, предотвращающие образование кровяного сгустка и сохраняющие кровь в жидком состоянии. Обычно используют два типа антикоагулянтов: ингибиторы тромбина и хелаторы ионов Ca^{2+} . В таблице 2 представлены антикоагулянты, используемые в коммерческих системах для взятия крови.

Антикоагулянты могут влиять на функционирование различных ферментных и сигнальных систем клетки, поэтому при выборе антикоагулянта важно учитывать, с какой целью производится забор крови. Так, гепарин ингибирует ПЦР, стимулирует агрегацию лейкоцитов и тромбоцитов, обесцвечивает мазки крови за счет закисления среды. ЭДТА-КЗ также провоцирует слипание лейкоцитов, способствуя ошибкам подсчета количества клеток. Фторид натрия ингибирует некоторые ферментативные реакции, включая превращение фосфоглицерата в фосфоенолпируват, предотвращает гликолиз, за счёт чего блокирует активность уреазы и некоторых других ферментов, поэтому образцы крови с фторидом натрия нельзя использовать для прямого определения ферментов. За счет связывания Ca^{2+} и увеличения внеклеточного калия и натрия в образцах крови с фторидом натрия/ЭДТА калия происходит выход воды и гемоглобина из эритроцитов, и наблюдается заметный гемолиз.

Механизм действия антикоагулянтов

Антикоагулянт	Механизм действия
Гепарин	Гепарин активирует создание комплексных соединений между антитромбином III и факторами свертывания крови. В таком комплексе факторы свертывания инактивируются необратимо.
ЭДТА	ЭДТА и его щелочные соли способны создавать хелатные соединения с ионами кальция с образованием растворимых высокостабильных комплексов.
Фторид натрия и ЭДТА калия	Фторид натрия и ЭДТА калия выступают в качестве антикоагулянтов, связывая ионы Ca^{2+} , фторид натрия стабилизирует уровень глюкозы.
Цитрат натрия	Антикоагуляционные свойства цитрата проявляются в формировании комплекса с ионами Ca^{2+} и эффективном удалении их из крови, за счет чего нарушаются Ca^{2+} -зависимые механизмы образования кровяного сгустка.
Цитрат натрия, теофиллин, аденозин и дипиридамол	Предотвращение активации тромбоцитов
Цитрат натрия, лимонная кислота и декстроза	Лимонная кислота является буфер-антикоагулянтом и поддерживает постоянный pH. Декстроза продлевает срок жизни клеток.
Апротинин и ЭДТА	Апротинин – ингибитор протеаз. ЭДТА – хелатирующий антикоагулянт, усиливает действие апротинина.

2.2. Лейкоциты в костном мозге

Ещё одним источником лейкоцитов является костный мозг. Суспензию клеток костного мозга можно разделить теми же способами, что и клетки крови. Костный мозг как источник лейкоцитов чаще используется при работе с мелкими грызунами. При исследовании клеток человека периферическая кровь более доступна, к тому же в

костном мозге человека нейтрофилы гетерогенны и функционально незрелы [110]. Костный мозг мыши, например, содержит большее количество зрелых нейтрофилов, чем костный мозг человека. Функционально зрелые нейтрофилы костного мозга мыши имеют большую жизнеспособность, чем гранулоциты крови, что расширяет возможности их использования в длительных экспериментах. Еще одним преимуществом использования костного мозга грызунов для выделения гранулоцитов является возможность получения большого количества клеток. Для выделения костного мозга животных используют крупные трубчатые кости, смывая клетки из полости и головки кости. Полученную суспензию используют для разделения фракций лейкоцитов на градиенте плотности или иммунологическими методами [109].

2.3. Выделение лейкоцитов из крови и костного мозга

2.3.1. Приготовление растворов

1. NaCl 0,9%: растворить 0,9 г NaCl в 100 мл ддН₂O, стерилизовать фильтрованием или автоклавированием.
2. Раствор Хэнкса без Ca²⁺ и Mg²⁺: 0,4 г KCl, 0,06 г KН₂РO₄, 8 г NaCl, 0,35 г NaHCO₃, 0,04788 г Na₂НРO₄, 1 г глюкозы растворить в стерильной воде, довести объём до 1000 мл, стерилизовать фильтрованием, хранить при 4 °С.
3. Рабочий раствор декстрана (3%): для приготовления 3% рабочего раствора взвесить 3 г декстрана-500 (молекулярный вес 200 000–500 000), растворить в 100 мл стерильного 0,9% NaCl, при необходимости нагреть до полного растворения.
4. Раствор для лизиса эритроцитов 10X: 8,02 г NH₄Cl, 0,84 г NaHCO₃, 0,37 г натрия ЭДТА растворить в стерильной воде, довести объём до 100 мл, стерилизовать фильтрованием, хранить при 4 °С до 6 месяцев. Перед использованием развести в 10 раз стерильной холодной водой для получения 1X буфера для лизиса эритроцитов.
5. Трипановый синий 0,5%: растворить 0,5 г трипанового синего в 100 мл 0,9% NaCl, профильтровать.

6. Рабочий раствор желатина (2,5%): 2,5 г желатина смешать с ~10-20 мл фосфатного буфера (ФСБ) комнатной температуры, оставить на 1-2 часа для набухания, затем довести объем до 100 мл. При необходимости нагреть до ~40 °С до полного растворения желатина, стерилизовать фильтрованием.

7. Фосфатный буфер 1X: 0,2 г K_2HPO_4 (1,47 мМ), 1,15 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (4,29 мМ), 8 г NaCl (137 мМ), 0,2 г KCl (2,68 мМ) растворить в стерильной воде, довести объем до 1000 мл; pH ~ 7,3, при необходимости довести NaOH. Стерилизовать фильтрованием или автоклавированием.

8. Фиколл с плотностью 1,077 г/мл: 5,7 г фиколла-400 и 9 г диатризоата натрия растворить в 100 мл стерильной воды. Для приготовления растворов большей или меньшей плотности увеличить или уменьшить количество фиколла-400. Измерить плотность получившегося раствора при помощи ареометра, при небольшом отклонении довести до нужного значения путем добавления сухого фиколла-400 или воды. Стерилизовать фильтрованием.

Для получения интактных неактивированных клеток все используемые материалы и реагенты должны быть стерильными, без эндотоксинов и пирогенов. Работу предпочтительно проводить в ламинарном боксе II класса защиты.

2.3.2. Выделение общей популяции лейкоцитов методом осадения декстраном

Метод основан на различной скорости оседания эритроцитов и лейкоцитов в присутствии декстрана. В качестве антикоагулянта при взятии крови используется гепарин, ЭДТА или цитрат натрия. Декстрановое осаждение может быть использовано как самостоятельная методика для выделения общей фракции лейкоцитов или как предварительный этап перед дальнейшим фракционированием. Схема выделения представлена на рисунке 8.

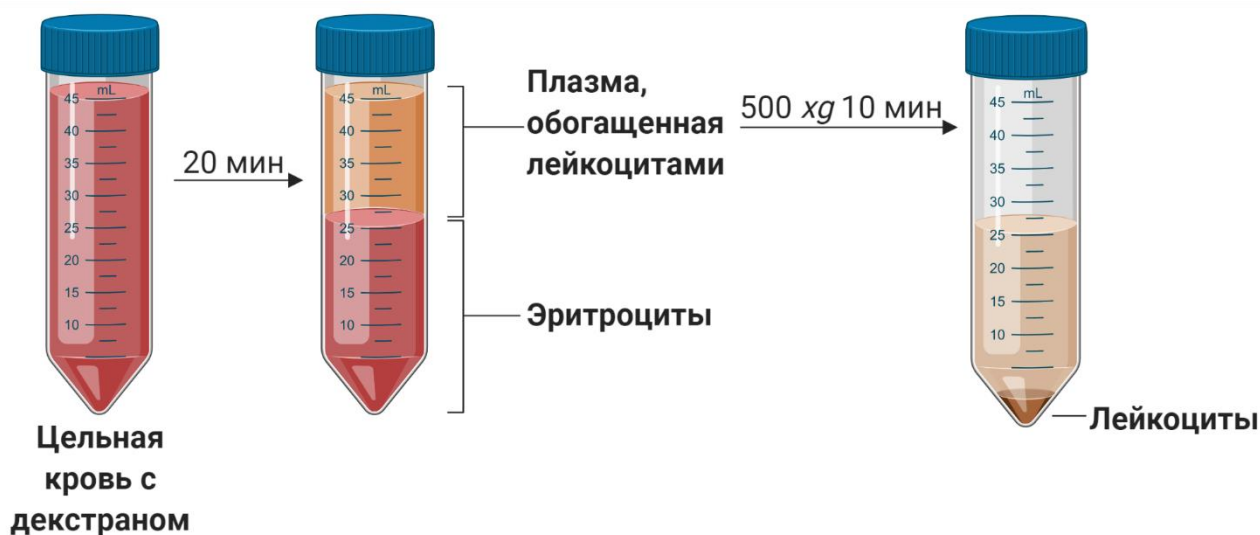


Рис. 8. Выделение лейкоцитов методом осаждения декстраном

Материалы и оборудование:

1. NaCl 0,9%;
2. Раствор Хэнкса без Ca^{2+} и Mg^{2+} ;
3. Рабочий раствор декстрана (3%);
4. *Опционально:* раствор для лизиса эритроцитов 1X;
5. *Опционально:* гемоцитометр, трипановый синий 0,5%, световой микроскоп;
6. Автоматические пипетки с наконечниками;
7. Центрифужные пробирки объемом 15-50 мл, штативы;
8. Центрифуга для пробирок объемом 15-50 мл с охлаждением до 4 °C и ускорением до $500 \times g$.

Протокол выделения:

1. Приготовить свежий рабочий раствор 3% декстрана.
2. В коническую центрифужную пробирку добавить равное количество свежей цельной крови с антикоагулянтом и 3% рабочего раствора декстрана.
3. Перемешать содержимое пробирки переворачиванием (около 10 раз) и оставить пробирку в вертикальном положении на 20 мин при комнатной температуре.
4. Отобрать в чистую пробирку верхний слой, содержащий

плазму и лейкоциты.

5. Осадить клетки центрифугированием в течение 10 мин при $500 \times g$ с охлаждением до 4°C , удалить супернатант.

При необходимости провести лизис эритроцитов: Непосредственно перед работой развести 10X буфер для лизиса эритроцитов до 1X; к 1 мл суспензии клеток добавить ~5-10 мл холодного 1X буфера для лизиса эритроцитов, инкубировать ~10 мин с покачиванием. При разрушении эритроцитов раствор приобретает равномерную красную окраску, интенсивность которой зависит от количества эритроцитов в суспензии. Осадить клетки центрифугированием в течение 10 мин при $300 \times g$ 4°C , удалить супернатант.

6. Ресуспендировать осадок в 10 мл 0,9% NaCl, аккуратно перемешать.

7. Повторить отмывку (п. 5), чтобы удалить остатки декстрана. После последней отмывки для получения концентрированной суспензии (при необходимости) развести клетки 1-2 мл раствора Хэнкса без Ca^{2+} и Mg^{2+} . При проведении дополнительного фракционирования можно приступить к следующим этапам без повторной отмывки.

8. Провести подсчет количества и жизнеспособности клеток в гемоцитометре с использованием трипанового синего или аналогичным методом.

2.3.3. Выделение лейкоцитов мыши с применением желатина

Как и декстран, желатин способен осаждать эритроциты и лейкоциты с разной скоростью. Желатиновый метод может быть использован для выделения общей лейкотромбоцитарной фракции или гранулоцитов [111].

Материалы и оборудование:

1. Рабочий раствор желатина (2,5%);
2. Фосфатный буфер 1X;
3. *Опционально:* раствор для лизиса эритроцитов 1X;
4. *Опционально:* гемоцитометр, трипановый синий 0,5%, све-

товой микроскоп;

5. Автоматические пипетки с наконечниками;
6. Центрифужные пробирки, штативы;
7. Центрифуга для пробирок с ускорением до $400 \times g$.

Протокол выделения лейкоцитов мыши:

1. Цельную кровь с антикоагулянтом центрифугировать в течение 15 мин при $755 \times g$.
2. Удалить плазму и лейкотромбоцитарный слой.
3. Нижний слой, содержащий гранулоциты и эритроциты, смешать с 4-5 мл 2,5% раствора желатина в фосфатном буферном растворе (рН 7,2).
4. Инкубировать смесь при $37 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 30 мин, отобрать супернатант, содержащий гранулоциты.
5. Осадить клетки центрифугированием 10 мин при $400 \times g$ при комнатной температуре.

При необходимости провести лизис эритроцитов (см. стр. 51).

6. Ресуспендировать клетки в фосфатно-солевом буфере или растворе Хэнкса без Ca^{2+} и Mg^{2+} , центрифугировать 10 мин при $300\text{-}400 \times g$. Повторить отмывку (п. 5-6) два раза.

2.3.4. Центрифугирование на градиенте плотности

Различия в плотности используются для разделения клеток крови на фракции и выделения отдельных популяций лейкоцитов. Центрифугированием на градиенте плотности разделяют цельную кровь, форменные элементы или только лейкоцитарную фракцию. При работе с небольшими объемами можно центрифугировать на градиенте цельную кровь, затем проводить дополнительную очистку. В изопикнических условиях, когда плотность клеток и раствора одинаковые, клетки задерживаются в растворе и остаются неподвижными. Для разделения применяют смеси полисахарида фикола-400 с метризоатом/диатризоатом (далее – фикола, коммерческие градиенты Ficoll-Nuраque, Histopaque), растворы перколла, сахарозы, бычьего сыворо-

точного альбумина и других веществ [4].

Принцип разделения крови на градиенте фиколла методом зонального центрифугирования для выделения мононуклеарных клеток человека (моноцитов и лимфоцитов) и гранулоцитов представлен на рисунке 9.

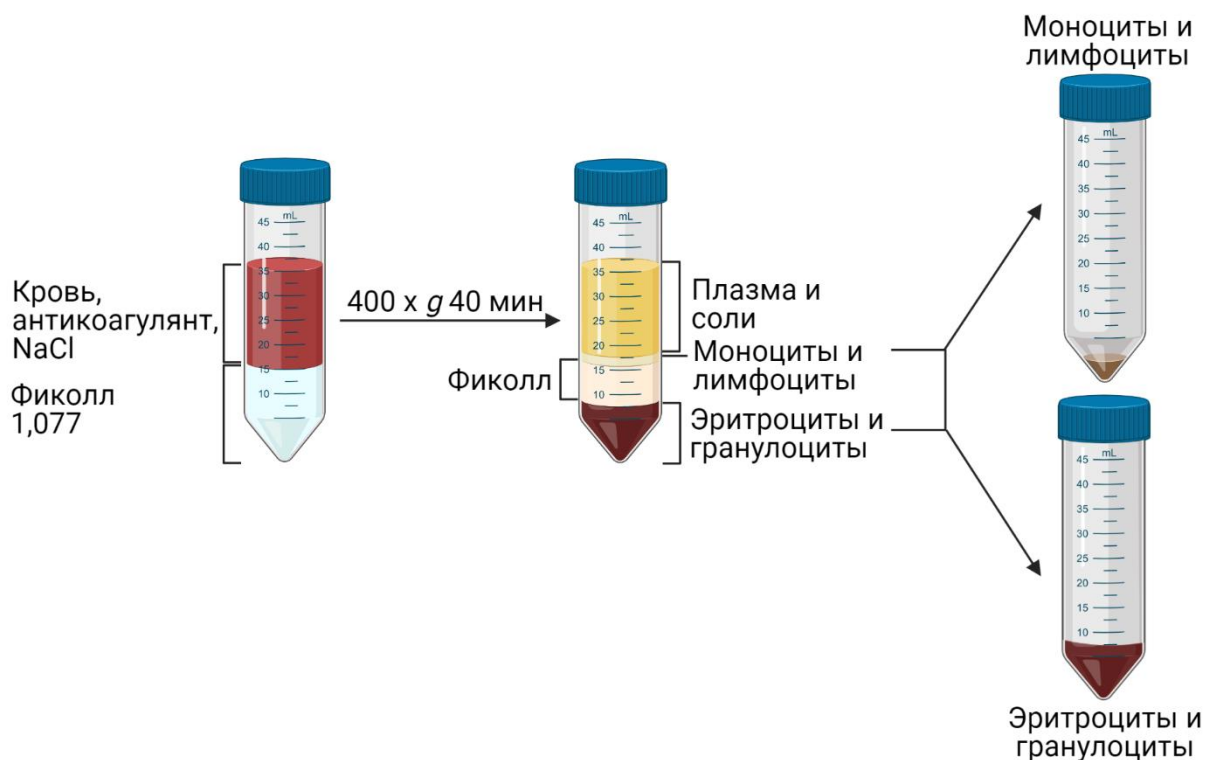


Рис. 9. Фракционирование клеток крови методом зонального центрифугирования на градиенте плотности фиколла

При больших объемах крови целесообразно провести предварительное осаждение эритроцитов декстраном, затем разделять лейкоцитарную массу на фракции. Перед началом работы необходимо подготовить клеточную суспензию: лейкоцитарную фракцию, полученную методом декстранового осаждения, форменные элементы или цельную кровь. Форменные элементы необходимо предварительно разбавить 0,9% NaCl в соотношении не менее 1:3, кровь разбавить в соотношении не менее 1:1.

Материалы и оборудование:

1. Раствор фиколла с плотностью 1,077 г/мл;

Удобнее использовать готовый (коммерческий) раствор фиколла, но при необходимости его можно приготовить самостоятельно (см. раздел 2.3.1.)

2. NaCl 0,9%;
3. Раствор Хэнкса без Ca^{2+} и Mg^{2+} ;
4. *Опционально:* раствор для лизиса эритроцитов 1X;
5. *Опционально:* гемоцитометр, трипановый синий 0,5%, световой микроскоп;
6. Автоматические пипетки с наконечниками;
7. Центрифужные пробирки объемом 15-50 мл, штативы;
8. Центрифуга для пробирок объемом 15-50 мл с охлаждением до 4 °С и ускорением до $500 \times g$ с регулировкой скорости разгона и торможения.

Протокол выделения:

1. Налить в центрифужную пробирку 2-3 мл фиколла с плотностью 1,077 г/мл на 10 мл суспензии клеток (увеличить количество пропорционально при необходимости) и аккуратно наслоить сверху клеточную суспензию, избегая перемешивания слоёв.

2. Центрифугировать при $400 \times g$ в течение 40 мин при комнатной температуре; необходимо использовать центрифугу с функцией регулировки скорости разгона и торможения и установить минимальную скорость.

3. После центрифугирования на границе плазмы и фиколла собираются моноклеарные клетки, под слоем фиколла – эритроциты и гранулоциты. Для сбора моноклеаров отобрать верхний слой, содержащий плазму и солевой раствор, затем собрать клетки и перенести их в чистую пробирку. Для сбора фракции эритроцитов/гранулоцитов удалить слой фиколла, не затрагивая клеточную фракцию.

4. К моноклеарам и гранулоцитам добавить не менее 10 мл

охлажденного раствора Хэнкса без Ca^{2+} и Mg^{2+} , затем центрифугировать $500 \times g$ 10 мин при 4°C , удалить супернатант.

5. При наличии небольшой примеси эритроцитов провести лизис (см. стр. 51). При выделении клеток из цельной крови/форменных элементов в гранулоцитарной фракции содержится большое количества эритроцитов. Для отделения эритроцитов можно применить метод декстранового осаждения (см. раздел 2.3.2).

6. Повторить отмывку (п. 4), ресуспендировать клетки в 1-2 мл раствора Хэнкса без Ca^{2+} и Mg^{2+} .

7. Провести подсчет количества и жизнеспособности клеток в гемоцитометре с использованием трипанового синего или аналогичным методом.

Мононуклеарная фракция, полученная при разделении на градиенте фиколла с плотностью 1,077 г/мл, содержит примесь тромбоцитов и других клеток. Чтобы более четко разделить фракции, можно использовать последовательное или параллельное центрифугирование на градиентах с разной плотностью. Например, в одном из подходов используется тройной градиент фиколла: последовательно наслаиваются растворы с плотностью 1,091, 1,077 и 1,064 г/мл, затем разбавленная кровь/лейкотромбоцитарная фракция, и проводится фракционирование при помощи центрифугирования. Моноцит-обогащенная фракция остается над слоем фиколла 1,064 г/мл, лимфоцитарная между 1,064 и 1,077 г/мл, гранулоцитарная – между 1,077 и 1,091 г/мл, эритроциты – в слое фиколла с плотностью 1,091 г/мл (рис. 10).

Для разделения мононуклеаров или выделения фагоцитов из общей лейкоцитарной массы также используют способность моноцитов и гранулоцитов к адгезии, которая не характерна для лимфоцитов. После разделения на градиенте плотности (например, фиколла 1,077 г/мл) мононуклеарные клетки помещают в культуральные планшеты, покрытые желатином или фибронектином, и инкубируют 2 ч при 37°C . Неприкрепленные клетки смывают, затем отделяют

прикрепившиеся клетки от поверхности планшета механическим способом [112].

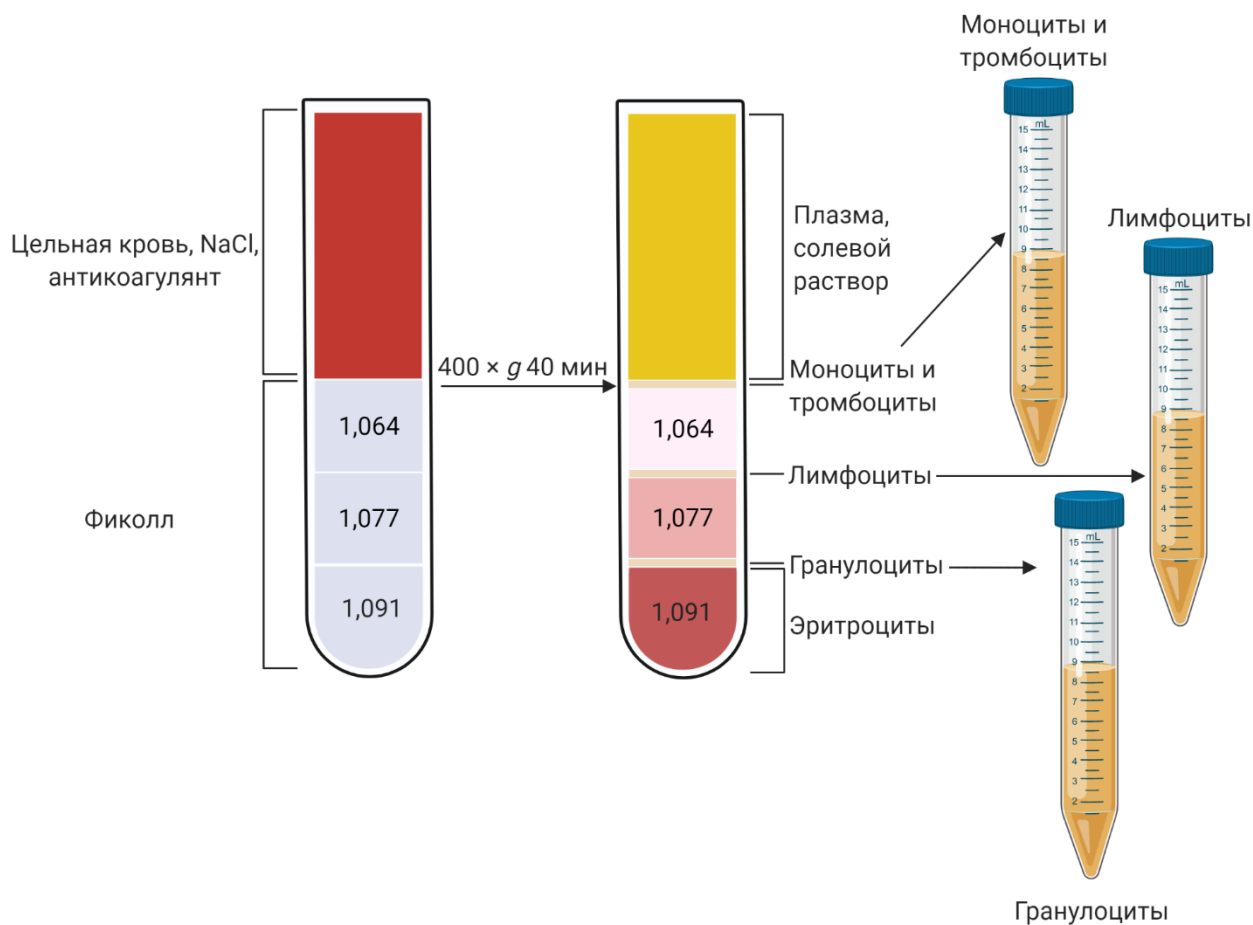


Рис. 10. Разделение клеток на тройном градиенте плотности фикола

Разделение лейкоцитов на градиенте плотности может проводиться с использованием йодиксанола (коммерческая среда OptiPrep). Из цельной крови при помощи центрифугирования сначала удаляют большую часть эритроцитов. Плазму, обогащенную лейкоцитами, смешивают с раствором йодиксанола до достижения плотности около 1,100 г/мл. Смесь помещают на дно пробирки, затем последовательно наслаивают градиенты с плотностью 1,084 и 1,068 г/мл и солевой раствор и центрифугируют при 600-800 × g в течение 15-20 мин. При центрифугировании моноциты мигрируют в толщу раствора 1,068 г/мл, лимфоциты на границу между слоями 1,068 и 1,084 г/мл, а гранулоциты на границу между слоем с плотностью 1,084 и исходным

образцом (рис. 11) [113].

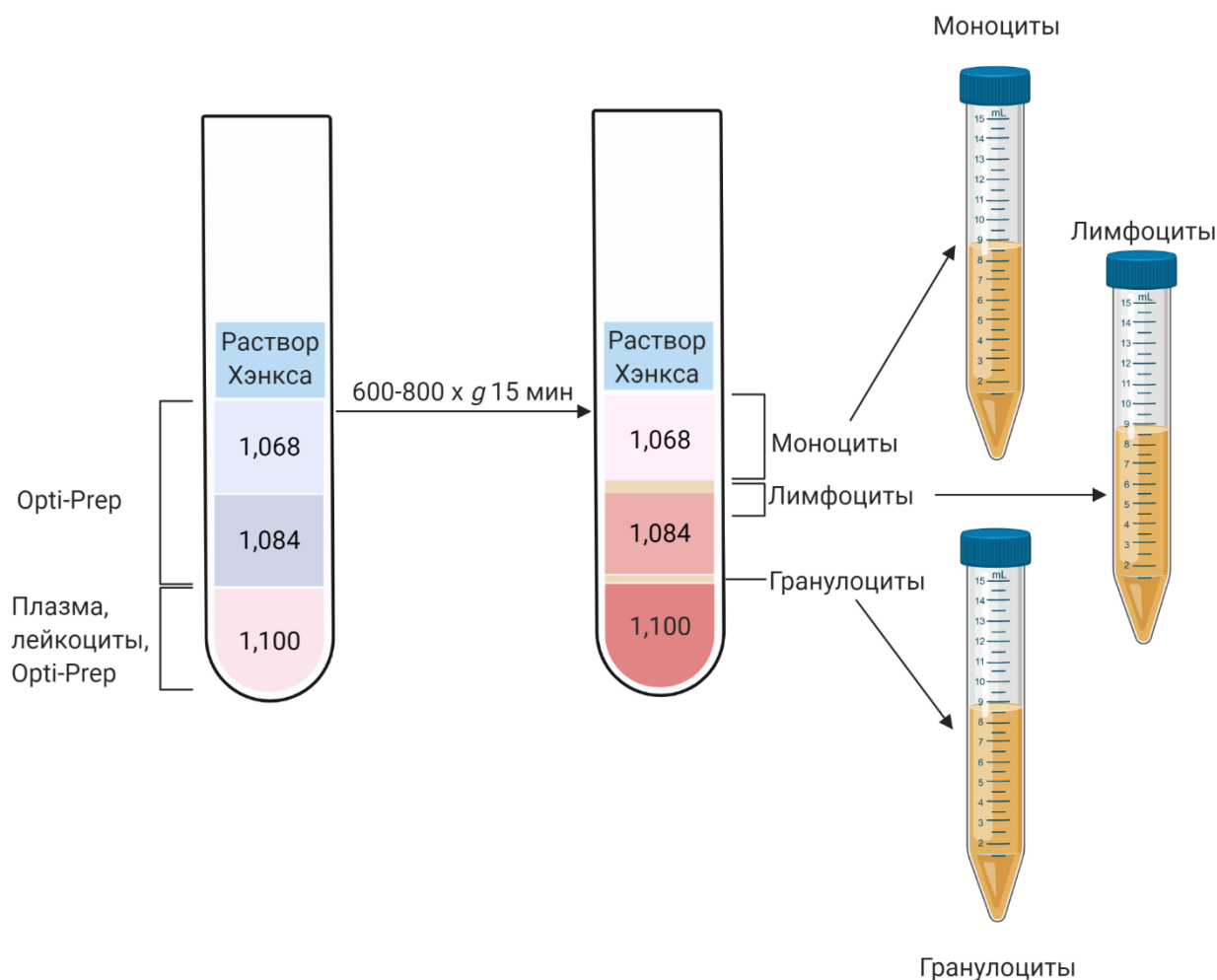


Рис. 11. Разделение клеток на градиенте плотности OptiPrep

При центрифугировании цельной крови и получении плазмы, обогащенной лейкоцитами, теряется часть моноцитов. Использование OptiPrep с плотностью 1,072 г/мл позволяет получить фракцию моноцитов из цельной крови. Разведенный OptiPrep смешивают с цельной кровью, получая смесь с плотностью около 1,110 г/мл, затем на эту смесь наслаивают раствор с плотностью 1,072 г/мл и раствор Хэнкса и центрифугируют при $700 \times g$ в течение 30 мин с охлаждением. Моноциты собирают в верхней части слоя с плотностью 1,072 г/мл. При таком подходе можно получить фракцию моноцитов с чистотой до 90 % и выходом около 40 %. Использование раствора OptiPrep с плотностью 1,074 г/мл даёт более высокий выход моноцитов (до 60 %), но снижает чистоту популяции до 85 % [114].

Перколл (Percoll) – коллоидный раствор кремниевых частиц диаметром 15-30 нм, покрытых поливинилпирролидоном. В солевом буфере перколл образует градиенты плотности при центрифугировании при $10\ 000 \times g$ в течение 15 мин. Клетки можно смешать с перколлом перед центрифугированием, и разделение клеток будет проходить совместно с формированием градиента (изопикническое центрифугирование). Также перколл используют для зонального центрифугирования, наслаивая клетки на готовые растворы с разной плотностью.

Методы центрифугирования на градиенте плотности используются как для выделения клеток человека, так и клеток животных. Для фракционирования клеток крови грызунов обычно используются растворы с большей плотностью (табл. 3).

Таблица 3

Плотность растворов для разделения лейкоцитов [4, 111]

Тип клеток	Плотность, г/мл		
	Перколл ¹	Фиколл	Йодиксанол
Клетки человека			
Моноциты	1,060	1,073	1,068
Лимфоциты	1,080	1,077	1,084
Гранулоциты	1,090	1,090	1,100
Клетки мыши			
Моноциты	1,083	1,077	1,076
Лимфоциты	1,090	1,084	1,084
Гранулоциты	1,110	1,119	1,119

¹ – согласно инструкции производителя

2.4. Метод вызванных фагоцитов

Альтернативой в получении достаточно большого количества фагоцитов лабораторных животных является метод вызванных гранулоцитов и макрофагов (рис. 12). В данном подходе используется способность фагоцитов мигрировать в очаг воспаления: животным

делают внутрибрюшинную инъекцию воспалительного либо асептического раздражающего агента и через 3-5 часов смывают гранулоциты, пришедшие в очаг воспаления. Через 10-12 часов в брюшной полости животного уже будут преобладать макрофаги. Преимущество данного метода в том, что выделяется большое количество клеток, причем чистота популяции гранулоцитов достигает 98-99 %. Однако при таком способе выделения клетки преактивированы, и для некоторых видов исследований это существенное ограничение.

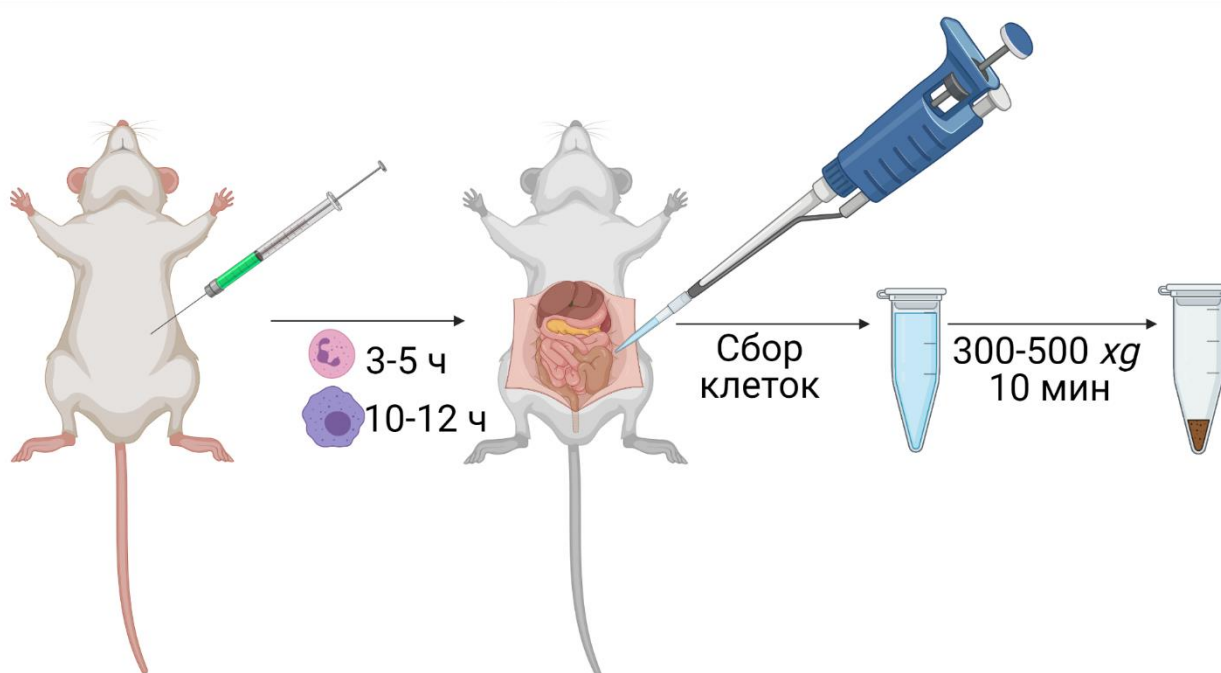


Рис. 12. Метод вызванных фагоцитов

2.5. Получение очищенных популяций лейкоцитов иммунологическими методами

Для дополнительного обогащения клеток и выделения минорных популяций используются методы, основанные на взаимодействии антиген-антитело: сортировка на магнитных частицах или сортировка при помощи цитофлуориметра-сортировщика. Цитофлуориметрия дает дополнительные возможности дифференцировать лейкоциты по размеру и гранулярности (рис. 13) [115].

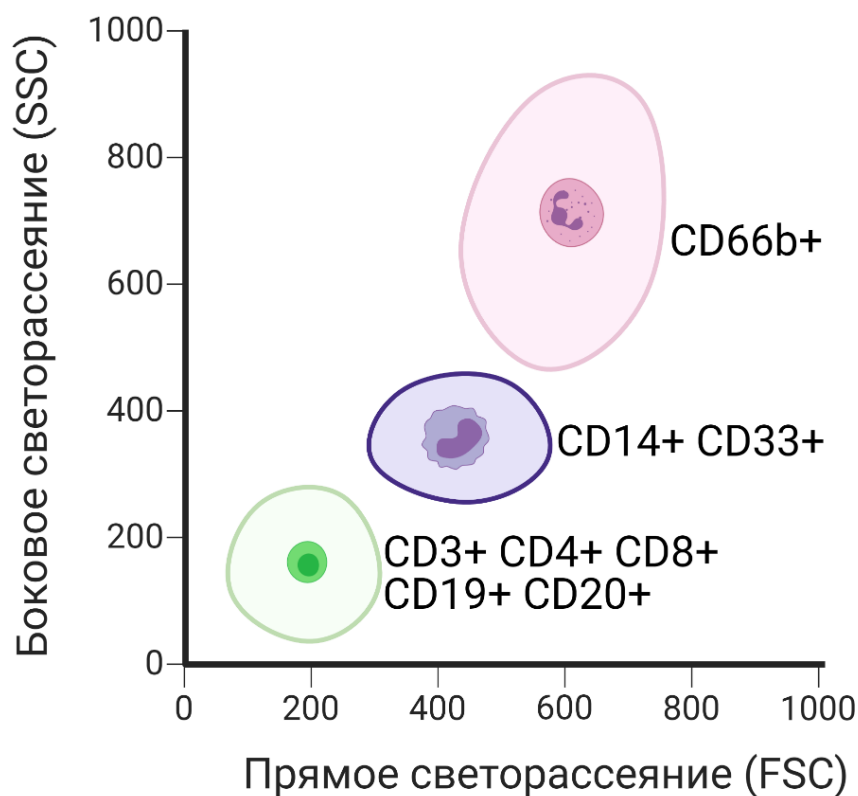


Рис. 13. Схема разделения лейкоцитов по размеру, гранулярности и экспрессии CD-маркеров при проведении цитофлуориметрического анализа

Таблица 4

CD-маркеры клеток крови человека [115]

Клетки	Маркер
Все лейкоциты	CD45
Т-лимфоциты	CD3, CD4, CD8
В-лимфоциты	CD19, CD20
Дендритные клетки	CD11c, CD123
Натуральные киллеры	CD56
Гемопоэтические стволовые клетки	CD34
Моноциты и макрофаги	CD14, CD33
Гранулоциты	CD66b
Тромбоциты	CD41, CD61, CD62
Эритроциты	CD235a

Кластеры дифференцировки лейкоцитов (англ. CD, cluster of differentiation) – поверхностные антигены лейкоцитов. Они представляют собой рецепторы, белки клеточной адгезии и другие белки, участвующие во взаимодействии клеток. В настоящее время доступно множество готовых коммерческих антител и наборов для выделения популяций клеток методами позитивной или негативной селекции. В таблице 4 приведены основные CD-маркеры, характеризующие отдельные типы клеток крови человека. Помимо перечисленных, лейкоциты экспрессируют множество других поверхностных маркеров, отвечающих за различные функции. Основные CD-маркеры гранулоцитов представлены в таблице 7 (Приложение 1).

ГЛАВА 3. ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ГРАНУЛОЦИТОВ

3.1. Анализ миграции клеток

Миграция лейкоцитов – важный механизм, участвующий в реализации воспаления и защиты от инфекций. Множество эндогенных и экзогенных факторов может стимулировать движение клеток. В зависимости от направления движения выделяют несколько видов миграции. Направленная миграция по градиенту концентрации вещества называется хемотаксисом. Направленная миграция против градиента концентрации – обратный хемотаксис (или фугетаксис, англ. “fugetaxis”). Случайная ненаправленная миграция, хемокинез, происходит при равномерном распределении аттрактанта. Разделение аттрактантов по типу миграции зачастую является условным. Один из наиболее сильных хемоаттрактантов, ИЛ-8, может вызывать хемотаксис или хемокинез в зависимости от наличия или отсутствия градиента, а в высокой концентрации обратный хемотаксис [116].

Для исследования хемотаксиса клеток обычно используется камера Бойдена, в которой клетки мигрируют под действием хемоаттрактанта через полупроницаемую мембрану. На основе камеры Бойдена разработаны сходные устройства, например, камеры Зигмонда и Данна. Другие подходы для исследования миграции включают микрофлюидные системы, 3D гели и приборы для автоматического исследования в реальном времени [116].

Исследование миграции лейкоцитов и опухолевых клеток, имеющих эпителиальное происхождение, значительно отличается. Лейкоциты, особенно гранулоциты, относятся к быстро мигрирующим клеткам, поэтому исследование проводится в течение 15-120 минут. К тому же работа с нейтрофилами, выделенными из крови, ограничивается коротким временем их жизни, что не позволяет использовать некоторые медленнодействующие ингибиторы. Также гранулоциты значительно мельче, и размер пор мембраны в камере Бойдена не должен превышать 3-5 мкм.

Для исследования миграции при помощи камеры Бойдена требуется культуральный планшет во вставками (рис. 14). Вставки

должны иметь мембрану с порами, покрытую фибриногеном или другим адгезивным агентом. Коммерческие наборы обычно содержат готовые к использованию планшеты с покрытием. Возможно использование различных форматов планшетов и вставок. В качестве хемоаттрактанта для изолированных нейтрофилов можно использовать 1,25 нМ ИЛ-8, 100 нМ fMLF, 11 нМ C5a [117].

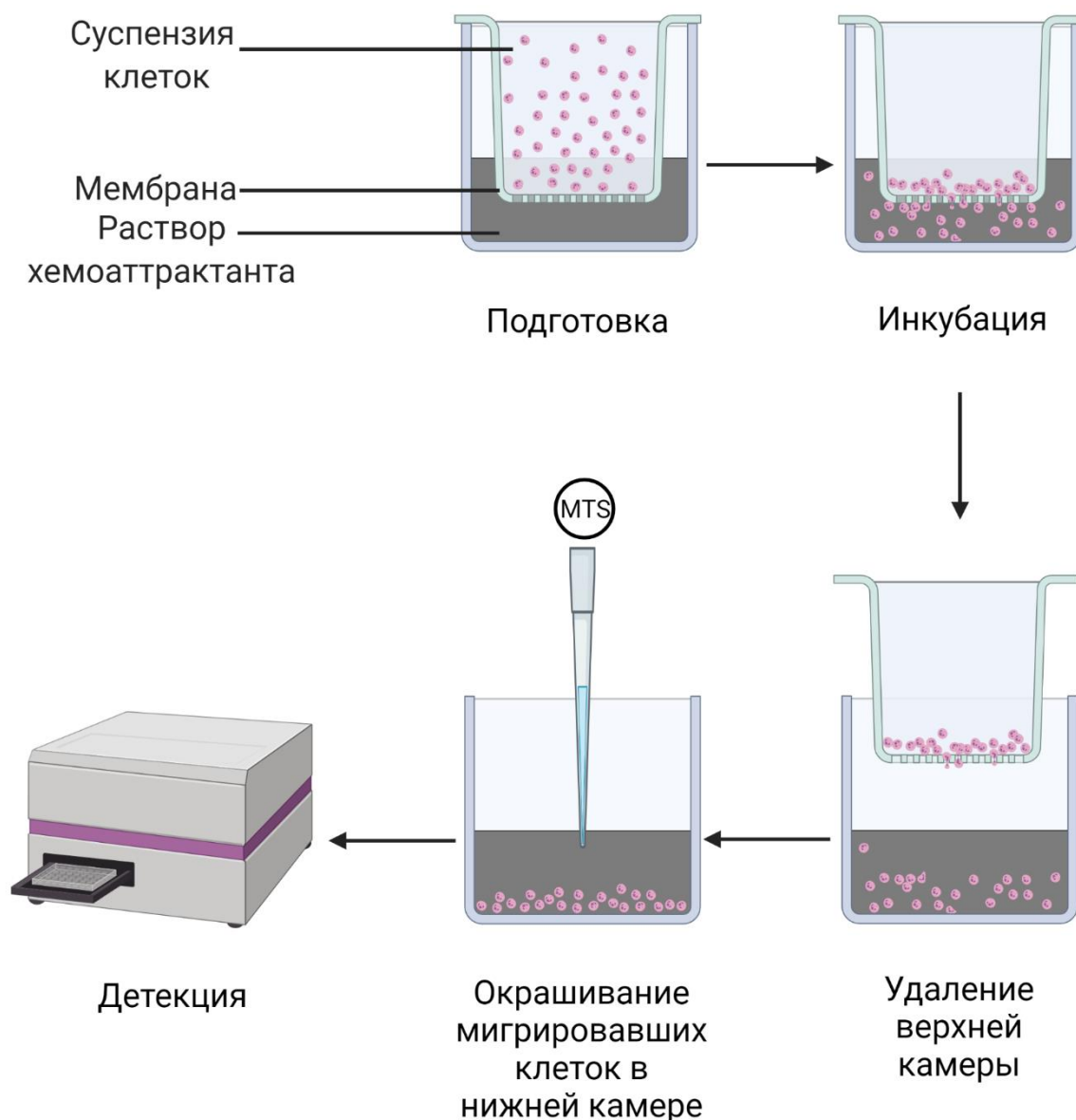


Рис. 14. Анализ миграции клеток при помощи камеры Бойдена

Материалы и оборудование:

1. Суспензия изолированных гранулоцитов (см. Главу 2);
2. Фибриноген для культур клеток;

3. Питательная среда для культур клеток (RPMI-1640 или DMEM без сыворотки);
4. Хемоаттрактант;
5. 0,5 М ЭДТА;
6. *Опционально:* а) гемоцитометр и трипановый синий 0,5%, световой микроскоп; б) кальцеин или MTS и планшетный флуориметр с соответствующими фильтрами;
7. Планшет для культур клеток с крышкой и вставками с полупроницаемой мембраной, диаметр пор мембраны 3-5 мкм;
8. Автоматические пипетки и наконечники;
9. Микропробирки, штативы;
10. Инкубатор на 37 °С;
11. Ламинарный бокс II класса защиты.

Работы проводятся в стерильных условиях с использованием стерильных материалов, не содержащих эндотоксины и пирогены. Количество реагентов приведено для 24-луночного планшета со вставками диаметром 12 мм.

Покрытие фибриногеном [117]:

1. Приготовить 2,5 мг/мл раствор фибриногена в ФСБ.
2. 600 мкл раствора фибриногена добавить в ячейку планшета (нижняя камера), 200 мкл нанести на мембрану (верхняя камера) и инкубировать в течение 1 ч при 37 °С.
3. После инкубации промыть камеру ФСБ два раза и высушить в течение 10-12 часов.

Анализ миграции клеток [117]:

1. Подготовить суспензию клеток с концентрацией 2×10^6 кл/мл. Один экспериментальный образец (ячейка) содержит 0,4-0,5 млн клеток в 200 мкл среды.
2. Внести 600 мкл среды, содержащей хемоаттрактант, в нижнюю камеру и 200 мкл суспензии клеток в верхнюю камеру.
3. Инкубировать при 37 °С в течение 2 ч.

4. Добавить в нижнюю камеру 60 мкл 0,5 М ЭДТА, инкубировать 10-15 мин 4 °С для диссоциации

5. Удалить вставку и определить количество клеток в нижней камере.

Для подсчета числа мигрировавших клеток можно использовать гемоцитометр или окрашивание клеток в последующим измерением окраски при помощи планшетного флуориметра.

При использовании гемоцитометра важно получить однородную суспензию клеток и аккуратно отбирать аликвоты для подсчета. В качестве флуориметрических красителей для анализа количества мигрировавших клеток наиболее часто используются кальцеин и MTS. Для количественной оценки в пустые ячейки планшета добавляются суспензии клеток с известной концентрацией, и по окрашиванию таких ячеек строится калибровочная кривая.

3.2. Исследование продукции активных форм кислорода

Исследования продукции АФК фагоцитами можно проводить как в суспензии изолированных клеток, так и в цельной крови. Существует несколько методов и подходов для оценки продукции АФК клетками. Пожалуй, наиболее распространенными методами можно назвать хемилюминесценцию с использованием люминесцентных зондов, а также флуоресценцию. Оба метода позволяют оценить прижизненную продукцию АФК в клетке.

Люминесцентные зонды при взаимодействии с АФК испускают кванты света, которые затем детектируются с помощью фотоумножителя. На рис. 15 представлена схема окисления люминола и образование 3-аминофтолата, который при переходе из электронно-возбужденного в основное состояние испускает кванта света [118]. Кроме люминола в хемилюминесценции используются и другие зонды, например, люцигенин и кумарин [118, 119]. Преимущество люминол-зависимой хемилюминесценции в том, что она позволяет изучать общую продукцию АФК: внеклеточную в ответ на растворимые стимулы (например, fMLF), внутриклеточную/внутрифагосомальную,

в ответ на фагоцитоз-опосредованную активацию респираторного ответа (например, зимозаном).

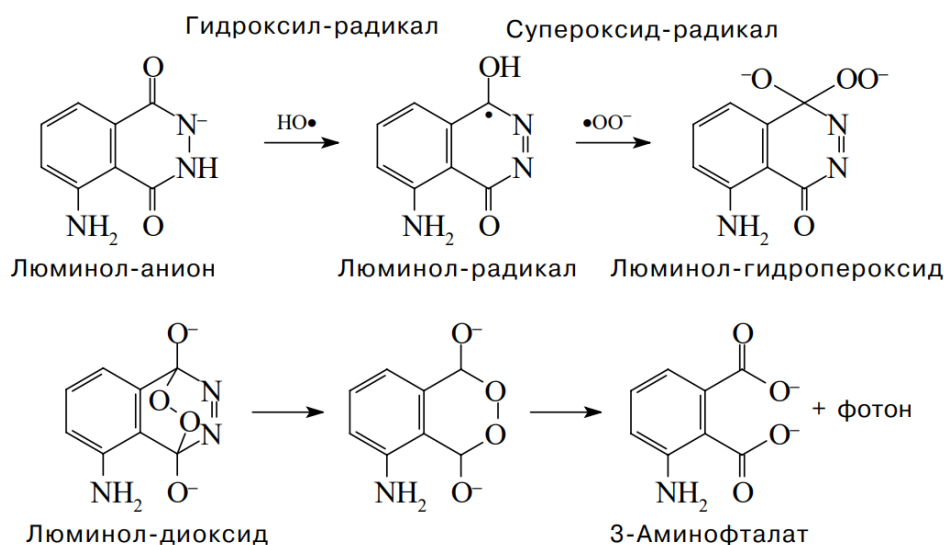


Рис. 15. Химические превращения люминола под действием радикалов гидроксила и супероксида

В настоящее время широкое применение находят и флуоресцентные зонды для детекции АФК в клетках (некоторые из них представлены в таблице 5 Приложения 1). Инструменты и методы, при помощи которых можно регистрировать флуоресцентные сигналы для оценки продукции АФК, также довольно разнообразны: флуоресцентная микроскопия, проточная цитометрия, флуориметрия в планшетах и т.д.

Для каждого из вышеперечисленных способов оценки продукции АФК есть свои преимущества и недостатки. Флуоресцентные зонды имеют ограничения по фотостабильности (склонность к выгоранию, либо, напротив, повышению свечения под действием лазера), в то время как люминесцентные зонды не имеют таких ограничений. Регистрация ответов в планшетах/кюветах дает возможность оценить суммарный ответ всех клеток в ячейке. Проточная цитометрия и микроскопия позволяют оценить функции отдельных клеток и популяций.

Существуют и колориметрические методы оценки. Достаточно давно известен так называемый НСТ-тест или тест восстановления нитросинего тетразолия, который отражает суммарную продукцию АФК нейтрофилами. В основе метода лежит способность превращения красителя нитросинего тетразолия, поглощенного фагоцитом, в диформазан под влиянием активных форм кислорода. Недостаток метода в том, что он не дает возможности прижизненной регистрации продукции АФК в клетках.

3.2.1. Люминол-зависимая хемилюминесценция

Материалы и оборудование:

1. Суспензия изолированных гранулоцитов (см. Главу 2);
2. Раствор Хэнкса без кальция: 138 мМ NaCl, 6 мМ KCl, 1 мМ MgSO₄, 1 мМ Na₂HPO₄, 5 мМ NaHCO₃, 5,5 мМ глюкоза, 10 мМ HEPES; pH 7,2-7,4; довести pH при помощи 0,1 М HCl, стерилизовать фильтрованием;
3. Раствор Хэнкса с кальцием: раствор Хэнкса с добавлением CaCl₂; pH 7,2-7,4; довести pH при помощи 0,1 М HCl, стерилизовать фильтрованием;
4. Раствор для регистрации ХЛ: раствор Хэнкса с 1,2 мМ кальцием с добавлением 0,35 мМ люминола; готовить непосредственно перед экспериментом, профильтровать и хранить в темноте;
5. Люминол (3-аминофталгидрозид): растворить в капле ДМСО, затем довести стерильной ддН₂О до концентрации 10 мМ, полученный мутный раствор титровать гидроксидом натрия до pH 8,0. Аликвоты хранить при -20 °С до использования. Рабочая концентрация люминола в ячейке 0,35 мМ;
6. fMLF: приготовить стоковый раствор 50 мМ в стерильном ДМСО, разделить на аликвоты и хранить при -20 °С до использования; рабочие растворы готовятся разведением в растворе Хэнкса непосредственно перед использованием;
7. РМА: приготовить стоковый раствор 1 мМ в стерильном ДМСО, разделить на аликвоты и хранить при -20 °С до использова-

ния; рабочие растворы готовятся разведением в растворе Хэнкса непосредственно перед использованием;

8. Планшет 96-луночный с оптически прозрачным дном, рабочий объем ячейки не менее 200 мкл;

9. Автоматические пипетки, дозатор (степпер) на 1-10 мкл с наконечниками;

10. Планшетный хемилюминометр с термостатированием;

11. Центрифуга с ротором для планшетов.

Ход работы:

1. Подготовить суспензию изолированных клеток в растворе Хэнкса, концентрация 10^6 кл/мл

2. В ячейки внести 180 мкл раствора для регистрации ХЛ.

3. Добавить 20 мкл суспензии клеток, каждая ячейка содержит 20 000 клеток, конечная концентрация CaCl_2 в ячейке 1 мМ.

Гранулоциты довольно быстро адгезируются на поверхности планшета, кроме того, после добавления можно осадить их на центрифуге (не более $300 \times g$ в течение 5 мин). Каждая проба, включая контроль, готовится в трех повторях.

*При исследовании модулирующего действия вещества добавить его в ячейку за 10-20 минут (или более в зависимости от вещества) до активации клеток и инкубировать в термостате на 37°C . **ВАЖНО!** Предварительно необходимо проверить, не способно ли данное вещество/его растворитель само окислять люминол или быть ловушкой АФК. Это можно сделать в бесклеточной среде с использованием системы ксантин/ксантиноксидаза.*

4. Поместить клетки в хемилюминометр с термостатированием на 37°C .

При работе с адгезионными клетками регистрацию осуществляют со дна ячеек.

5. Для оценки спонтанного уровня синтеза АФК клетками провести регистрацию ХЛ в течение 5 минут до добавления стимула.

6. После регистрации спонтанного уровня, добавить стимул (например, fMLF, в концентрации от 0,01 до 1 мкМ или РМА 1 мкМ) и продолжить регистрацию клеточных ответов.

Не рекомендуется заполнять все ячейки планшета одновременно при работе с активаторами, вызывающими быстрые ответы, например, fMLF. Для добавления стимула удобно использовать степпер или многоканальную пипетку.

7. Оценку продукции АФК можно провести по нескольким параметрам: максимальная амплитуда ответа, площадь под кривой (интеграл) зависимости интенсивности ответа от времени (что соответствует общей продукции АФК за определенный промежуток времени), скорость нарастания и спада ответа.

3.2.2. Оценка продукции АФК с помощью флуоресценции

Материалы и оборудование:

1. Суспензия изолированных гранулоцитов (см. Главу 2);
2. Раствор Хэнкса (см. раздел 3.2.1.);
3. Раствор Хэнкса с 1,2 мМ кальцием (см. раздел 3.2.1.);
4. Стоковый раствор fMLF (см. раздел 3.2.1.);
5. Стоковый раствор РМА (см. раздел 3.2.1.)
6. Планшет 96-луночный с оптически прозрачным дном для флуориметрии, рабочий объем ячейки не менее 200 мкл;
7. Стоковый раствор дигидрородамина-123 (dihydrorhodamine 123): 10 мМ в ДМСО, аликвоты хранить на -80°C до использования.

При использовании другого зонда приготовить стоковый раствор согласно рекомендации производителя.

8. Автоматические пипетки, дозатор (степпер) на 1-10 мкл с наконечниками;
9. Планшетный флуориметр с термостатированием и перемешиванием;
10. Центрифуга с ротором для планшетов.

Протокол оценки продукции АФК методом с помощью планшетного флуориметра [120]:

1. Подготовить суспензию изолированных клеток в растворе Хэнкса, концентрация 10^6 кл/мл;

2. Для нагрузки клеток дигидрородамином-123 добавить 1 мкл стокового раствора на 1 мл суспензии клеток, инкубировать в течение 30 мин при 37 °С, периодически перемешивая.

3. Трижды промыть клетки раствором Хэнкса, центрифугировать при $300 \times g$ в течение 5 мин.

Нагрузку клеток другим флуоресцентным зондом провести согласно рекомендации производителя.

ВАЖНО! *Флуоресцентные зонды обладают некоторой цитотоксичностью и потому для каждого типа клеток нужно подбирать рабочую концентрацию зонда эмпирически. В качестве буфера для нагрузки можно использовать фосфатный буфер или раствор Хэнкса.*

4. Внести в ячейки 180 мкл раствора Хэнкса с 1,2 мМ кальцием, добавить 20 мкл суспензии нагруженных флуорофором клеток, осадить клетки центрифугированием при $300 \times g$ в течение 5 мин.

Каждая проба, включая контроль, готовится в трех повторях. В каждый планшет включаются контрольные ячейки для регистрации фонового свечения флуоресцентного зонда (фон), когда в ячейки добавляются только нагруженные зондом клетки и никакого стимула. В качестве положительного контроля можно использовать экзогенные АФК (перекись водорода).

5. Установить длины волн возбуждения и эмиссии: 510 и 540 нм, соответственно, для дигидрородамина-123; установить термостатирование на 37 °С.

6. Поместить клетки в прибор, провести регистрацию спонтанной продукции АФК в течение 5 мин до добавления стимула.

7. Внести стимул (например, fMLF 1 мкМ) и продолжить регистрацию.

При оценке кинетики респираторного ответа крайне важно учитывать фотостабильность используемого зонда. Флуоресцентные зонды на основе флуоресцеина склонны к фотовыгоранию, а родамин, напротив, начинает самопроизвольно светиться. В виду это-

го, в каждом эксперименте необходимо найти оптимальные временные интервалы считывания интенсивности свечения. Так, например, оптимальным при работе с медленными ответами (например, на зимозан или РМА) будет считывание каждые 5-10 минут в течение часа, для быстрых и коротких ответов (fMLF) – каждые 5-15 с в течение 5-10 минут. При анализе данных для каждого эксперимента из значений, полученных в контрольных и опытных ячейках, нужно вычесть значения интенсивности свечения в ячейках фонового свечения.

Аналогично хемилюминесценции можно оценить амплитуду ответа, общую продукцию АФК как интеграл зависимости интенсивности флуоресценции от времени, скорость нарастания и убывания ответов.

Регистрацию флуоресценции можно проводить при помощи проточного цитометра. Подготовка клеток к проточной цитометрии происходит аналогичным образом: нагрузка, отмывка, короткий покой. Подготовить стимулы и пробы: отрицательный контроль – нагруженные зондом клетки без стимула, положительный контроль – экзогенные АФК, опытные образцы. Стимуляцию следует проводить при температуре 37 °С в темном месте, затем как можно быстрее проводить измерение. Предварительно необходимо идентифицировать популяции клеток по прямому и боковому светорассеянию, затем отрегулировать напряжение, используя нестимулированные и стимулированные контрольные образцы.

3.2.3. Тест на восстановление нитросинего тетразолия

Тест на восстановление нитросинего тетразолия (НСТ) является одним из первых разработанных методов оценки оксидазной активности фагоцитов [121, 122]. Метод основан на превращении поглощенного фагоцитом растворимого красителя нитросинего тетразолия в нерастворимый диформазан под влиянием супероксид-аниона, образующегося в НАДФН-оксидазной реакции. Был предложен способ спектрофотометрического определения супероксида с использовани-

ем раствора НСТ в ДМСО. НСТ переходит в моноформазаза при концентрации супероксида, меньшей или равной удвоенной концентрации НСТ, максимум поглощения моноформазаза в ДМСО наблюдается при 680 нм. При концентрации супероксида, превышающей концентрацию НСТ в 4 и более раз, весь НСТ превращается в диформазаза, максимум поглощения которого около 730 нм. В присутствии щелочи весь НСТ и диформазаза превращается в моноформазаза [123].

Нарушение способности нейтрофилов к восстановлению НСТ отражает дефекты кислородзависимых бактерицидных механизмов и может служить прогностическим критерием инфекционных осложнений. При проведении анализа используют живые клетки, которые фиксируют лишь после инкубации с НСТ. Тесты разделяют на спонтанный (без дополнительной стимуляции) и индуцированный или стимулированный НСТ-тест (при стимуляции нейтрофилов *in vitro*). Спонтанный НСТ-тест отражает степень функциональной активации клеток *in vivo*, индуцированный – бактерицидный резерв клетки.

Материалы и оборудование:

1. Суспензия изолированных клеток с концентрацией $0,5 \times 10^6$ кл/мл в растворе Хэнкса с Ca^{2+} и Mg^{2+} ;
2. ФСБ;
3. Раствор НСТ 0,1% в ФСБ;
4. NaOH 0,2 н;
5. РМА 10 мкМ в ФСБ;
6. ДМСО;
7. Планшет для ИФА 96-луночный;
8. Автоматические пипетки с наконечниками;
9. Инкубатор/термостат для планшетов на 37 °С;
10. Планшетный спектрофотометр на 680 нм.

Ход работы:

1. Внести по 100 мкл суспензии клеток в ячейки 96-луночного планшета (50 тыс. на лунку). В ячейки с холостой пробой (blank) вне-

сти 100 мкл раствора Хэнкса с Ca^{2+} и Mg^{2+} .

Все образцы готовятся в трех повторях.

2. Инкубировать 1 час при 37 °С для прикрепления клеток.
3. Промыть ячейки 2-3 раза 200 мкл тёплого ФСБ.
4. Добавить в ячейки 100 мкл 0,1% раствора НСТ.
5. Внести в ячейки с образцами 10 мкл РМА (конечная концентрация 1 мкМ), в контрольные ячейки и в ячейки с холостой пробой 10 мкл ФСБ.
6. Инкубировать 1-2 часа при 37 °С.
7. Промыть ячейки 2-3 раза 200 мкл тёплого ФСБ.
8. Удалить раствор из ячеек, высушить планшет.
9. Добавить в ячейки 100 мкл NaOH 0,2 н, инкубировать 15 мин при 37 °С.
10. Добавить в ячейки 100 мкл ДМСО.
11. Измерить оптическую плотность при 680 нм.
12. Вычесть из результатов, полученных для контрольных и опытных ячеек, оптическую плотность холостой пробы.
13. Рассчитать индекс стимуляции как отношение оптической плотности образца к контролю.

3.3. Оценка созревания и окисления фагосом

В настоящее время разработано множество методов оценки фагоцитоза, одним из наиболее удобных является использование частиц, конъюгированных с флуоресцентными зондами. Эти зонды позволяют оценить не только захват частиц, но и физиологию процесса, а именно созревание фаголизосом. Наиболее простой способ оценки фагоцитоза – детекция захваченных латексных частиц при помощи проточного цитометра. Современные технологии позволяют получать живые бактерии, экспрессирующие флуоресцентные белки, при добавлении таких бактерий к суспензии фагоцитов происходит их захват и формирование фагосом. Клетки отмывают от незахваченных бактерий с помощью среды, содержащей антибиотик, затем проводят подсчет внутриклеточных бактерий [124, 125].

Фагоцитоз — это не только и не столько захват чужеродных частиц, бактерий и вирусов. Внутри фагосомы запускаются последовательные реакции, начиная от продукции АФК и окисления за счет привлечения протонной помпы, до слияния с лизосомами, содержащими гидролизующие ферменты. Все эти процессы направлены на уничтожение патогена.

Для оценки продукции АФК внутри фагосом используются упомянутые выше флуоресцентные зонды. Эти зонды «пришиваются» к зимозану, латексным и другим частицам. Для оценки окисления внутрифагосомального пространства используют частицы с рН-чувствительными зондами, например, pHrodo Red Zymosan Bioparticle Conjugate for Phagocytosis (Thermo Fisher Scientific, США). В нейтральной среде флуорофор pHrodo неактивен, но он начинает светиться в присутствии протонов. Кроме того, частицы для фагоцитоза можно конъюгировать двумя флуорофорами, один из которых не чувствителен к рН и является маркером присутствия, а второй рН-чувствительным зондом pHrodo. Это позволяет отслеживать частицы в режиме реального времени при флуоресцентной микроскопии за счет маркерного флуорофора, а затем при попадании частицы внутрь фагосомы и ее окислении по свечению pHrodo.

3.3.1. Исследование созревания фагосом с помощью рН-чувствительного флуоресцентного зонда

Материалы и оборудование:

1. Полная ростовая среда RPMI-1640 или DMEM;
2. ФСБ;
3. Частицы с рН-чувствительным флуоресцентным зондом pHrodo Red Zymosan Bioparticle Conjugate for Phagocytosis;
4. Автоматические пипетки с наконечниками;
5. Микропробирки, штативы;
6. Чашки Петри 35 мм со стеклянным дном для микроскопии;
7. Флуоресцентный или лазерный сканирующий (конфокальный) микроскоп с модулем для термостатирования;
8. Микроцентрифуга;

9. Ультразвуковой дезинтегратор;
10. CO₂-инкубатор для культур клеток.

Ход работы:

1. Частицы pHrodo Red Zymosan Bioparticle Conjugate for Phagocytosis восстановить в фосфатном буфере, дважды отмыть, ресуспендировать в ФСБ в концентрации 2 мг/мл.

В таком виде частицы могут храниться при температуре 4 °C в течение недели, для более длительного хранения добавить азид натрия.

2. 20-30 мкл суспензии изолированных клеток поместить в центральной стеклянной части чашки Петри, накрыть крышкой и оставить на 2-5 минут в термостате на 37 °C для прикрепления клеток.

3. Аккуратно добавить 1-2 мл теплой среды, чтобы смыть не прикрепившиеся клетки, удалить среду, добавить 2-3 мл свежей теплой среды и оставить клетки на 1-2 часа в CO₂-инкубаторе.

4. Подготовить частицы: обработать их ультразвуком в течение 2-5 минут, чтобы разбить агрегаты, развести в 10 раз ФСБ (~0,2 мг/мл).

5. Подготовить микроскоп, модуль для термостатирования, настроить канал регистрации: длина возбуждения 560 нм, эмиссии 590 нм.

6. Установить чашку Петри с клетками на предметный столик, найти группу не менее пяти клеток. Определить границы z-сканирования, провести съемку неактивированных клеток с шагом ~ 1 мкМ.

7. Внести 10-20 мкл частиц непосредственно над клетками, начать регистрацию.

В зависимости от состояния клеток по мере оседания частиц они будут захватываться клетками, и будет появляться свечение pHrodo.

8. Проводить съемку в течение 40-60 мин с интервалом 5-10 мин.

9. Провести анализ зависимости интенсивности флуоресценции pHrodo от времени.

Процесс созревания фагосом может отличаться для гранулоцитов и моноцитов/макрофагов. Моноциты экспрессируют меньше НАДФН-оксидазы на поверхностной мембране, но больше на мембране фагосом, их основная задача – презентация антигена, в связи с чем эти клетки должны убить бактерию и деградировать ее белки до коротких пептидов и презентировать с помощью главного комплекса гистосовместимости. Для этого процесса необходимо эффективное окисление внутрифагосомального пространства, т.к. оптимальные значения рН для протеаз ~ 4,0-5,0.

3.3.2. Оценка окисления фагосом с помощью флуориметрии

Материалы и оборудование:

1. Раствор Хэнкса (см. раздел 3.2.1);
2. Раствор Хэнкса с кальцием (см. раздел 3.2.1);
3. ФСБ;
4. Частицы с рН-чувствительным флуоресцентным зондом pHrodo Red Zymosan Bioparticle Conjugate for Phagocytosis;
5. Автоматические пипетки с наконечниками;
6. Микропробирки, штативы;
7. Планшет 96-луночный с оптически прозрачным дном для флуориметрии, рабочий объем ячейки не менее 200 мкл;
8. Флуоресцентный спектрофотометр с модулем для термостатирования и перемешивания;
9. Микроцентрифуга;
10. Ультразвуковой дезинтегратор;
11. CO₂-инкубатор для культур клеток.

Ход работы:

1. Подготовить частицы для анализа (см. раздел 3.3.1. или инструкцию производителя).
2. Ресуспендировать клетки с растворе Хэнкса в концентрации $0,5 \times 10^6$ кл/мл.

3. Внести в ячейки 180 мкл раствора Хэнкса с 1,2 мМ кальция, добавить 20 мкл суспензии клеток (5 000 – 10 000 клеток на лунку).
4. Инкубировать клетки 1-2 часа при 37 °С и 5 % CO₂.
5. Добавить 10 мкл меченых pHrodo частиц (концентрация 0,2 мг/мл), для синхронизации захвата в каждой ячейке центрифугировать при 300 × g в течение 5 минут.
6. Перенести планшет во флуориметр с термостатированием при 37 °С, регистрировать флуоресценцию с интервалом 3-5 минут, длины волн возбуждения и эмиссии 560/590 нм, соответственно.
7. Построить кривые зависимости интенсивности флуоресценции от времени, оценить скорость накопления флуоресценции.

3.4. Анализ дегрануляции

После активации клеток различными стимулами содержимое гранул выбрасывается в фагосому или внеклеточное пространство – этот процесс называется дегрануляцией. Дегрануляцию можно оценить по количеству и активности ферментов, содержащихся в гранулах [4].

3.4.1. Подготовка образцов для анализа

Протокол составлен на основании работы Vedouhene с соавторами [4] с изменениями.

Материалы и оборудование:

1. Цитохалазин В: стоковый раствор 0,5 мг/мл в стерильном ДМСО. Разделить на аликвоты, хранить при -20 °С до использования.
2. Раствор Хэнкса без Ca²⁺ и Mg²⁺ (см. раздел 2.3.1.);
3. ФСБ с 0,5% ЦТАБ;
4. fMLF или другой стимул;
5. Микропробирки, штативы;
6. Автоматические пипетки с наконечниками;
7. Ёмкость со льдом;
8. Термостат (термошейкер) для микропробирок на 37 °С;

9. Центрифуга для микропробирок с ускорением до $15\ 000 \times g$;
10. Ультразвуковой дезинтегратор.

Ход работы:

1. Подготовить суспензию нейтрофилов с концентрацией 10^7 кл/мл в растворе Хэнкса;
2. В микропробирки поместить 500 мкл суспензии (5×10^6 клеток), инкубировать 5 мин при $37\ ^\circ\text{C}$.
3. Добавить 5 мкл цитохалазина В до конечной концентрации 5 мкг/мл, аккуратно перемешать, инкубировать 2 мин при $37\ ^\circ\text{C}$.
4. Добавить 1 мкМ fMLF, аккуратно перемешать, инкубировать в течение 2 мин при $37\ ^\circ\text{C}$.
5. Перенести пробирки на лёд, оставить на 5 мин;
6. Центрифугировать 30 с при $12\ 000 \times g$.
7. Перенести супернатант в новую пробирку, осадок поместить на лёд.
8. Центрифугировать супернатант 10 мин при $15\ 000 \times g$, перенести супернатант в новую пробирку, поместить на лёд до начала измерений.
9. К осадку клеток добавить 500 мкл холодного ФСБ с 0,5% ЦТАБ, обработать ультразвуком 2 раза по 10 с.
10. Центрифугировать 10 мин при $15\ 000 \times g$ при $4\ ^\circ\text{C}$, перенести супернатант в чистую пробирку и поместить на лёд до начала измерений.

3.4.2. Измерение активности миелопероксидазы

Миелопероксидаза во внеклеточном супернатанте характеризует первичные гранулы нейтрофилов: их количество в клетках, эффективность дегрануляции в ответ на стимул и активность ферментов. Методика измерения активности МПО основана на способности орто-дианизина образовывать окрашенные продукты при окислении пе-

роксидом водорода. Протокол составлен на основании протокола Bedouhene с соавторами [4] с изменениями.

Материалы и оборудование:

1. Образцы внеклеточных супернатантов (раздел 3.4.2. п. 8) и клеточных лизатов (раздел 3.4.2. п. 10);
2. Орто-дианизин дигидрохлорид: раствор 1,67 мг/мл в ФСБ; готовить непосредственно перед измерением;
3. Раствор H_2O_2 0,005%;
4. Микропробирки, штативы;
5. Автоматические пипетки с наконечниками;
6. Кюветный/планшетный спектрофотометр;

Ход работы:

1. Смешать 50 мкл супернатанта (опыт) или лизата клеток (контроль) и 350 мкл ФСБ.
2. Добавить 50 мкл 1,67 мг/мл раствора орто-дианизин дигидрохлорида.
3. Добавить 50 мкл 0,005% раствора H_2O_2 .
4. Перемешать реакционную смесь, перелить в кювету или ячейку планшета.

При измерении в планшете или микрокювете объем компонентов реакционной смеси можно уменьшить в 2 раза.

5. Измерить кинетику оптической плотности при 460 нм в течение 10 мин при комнатной температуре.
6. Активность МПО рассчитывается как отношение скорости ферментативной реакции (изменение оптической плотности) в опытном и контрольном образце.

Дегрануляцию можно исследовать методами иммуноблота или ИФА. Анализ данных проводится аналогично анализу активности МПО: рассчитывается отношение количества белка во внеклеточных супернатантах и лизатах клеток. Для исследования нейтрофильных ферментов подходят стандартные методики [126], но обычно требуется увеличить количество ингибиторов протеаз, по-

сколько их высокая концентрация в образцах вызывает деградацию исследуемых белков-ферментов гранул.

3.4.3. Измерение активности протеолитических ферментов гранул

Для исследования активности протеаз используют хромогенные субстраты, например, короткие пептиды, конъюгированный с хромофором р-нитроанилидом (pNA). Свободный pNA, который высвобождается при деградации субстрата, можно детектировать спектрофотометрически при длине волны 410 нм. Примеры субстратов и специфичных ферментов приведены в таблице 5.

Таблица 5

Субстраты для исследования активности протеаз

Субстрат	Фермент
MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA (70967-90-7) ¹	Эластаза лейкоцитов человека
NAc-Ile-Glu-Pro-Asp-pNA (216757-29-8) NAc-Ile-Glu-Thr-Asp-pNA (219138-21-3)	Каспаза 8 и гранзим В
N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (70967-97-4)	Катепсин G лейкоцитов человека
Gly-Pro-pNA (103213-34-9)	Дипептидилпептидаза IV
H-Leu-pNA Cl (16010-98-3)	Лейциновая аминопептидаза
H-Lys-pNA 2HBR (40492-96-4)	Лизиновые аминопептидазы и различные протеазы
BZ-Tyr-pNA (6154-45-6)	Сериновые карбоксипептидазы и различные протеазы
Suc-Phe-pNA (2440-62-2)	Химотрипсин
Pyr-Glu-Phe-Leu-pNA (85901-57-1)	Тиоловые протеазы (папаин, фицин и бромелаин)

<p>N-Suc-Ala-Ala-Ala-pNA (52299-14-6)</p>	<p>Химотрипсин-подобные сериновые протеазы, эластазы и сериновые пептидазы</p>
---	--

¹ – в скобках приведен CAS номер соединения

Эластаза – нейтральная сериновая протеаза, которая продуцируется клетками поджелудочной железы и фагоцитами. Субстратами эластазы служат эластины и другие белки внеклеточного матрикса, компоненты клеточной мембраны, белки кровяного сгустка, системы комплемента, антитела, цитокины. Эластаза в составе белков первичных гранул продуцируется нейтрофилами в ответ на стимуляцию цитокинами и хемоаттрактантами, такими как ФНО- α , ИЛ-8, С5а, ЛПС, fMLF [127]. Для измерения активности эластазы используется субстрат MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA [128].

Материалы и оборудование:

1. Образцы внеклеточных супернатантов (раздел 3.4.2. п. 8) и клеточных лизатов (раздел 3.4.2. п. 10);
2. Буфер: 0,1 М ХЕПЕС (рН 7,5) или 100 мМ Трис HCl (рН 8,0);
3. Субстрат: MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA 2 мг/мл в буфере;
4. Контрольный раствор эластазы 1 мкг/мл;
5. Планшет для ИФА 96-луночный;
6. Автоматические пипетки с наконечниками;
7. Термостат для планшетов на 25 °С;
8. Планшетный спектрофотометр на 405 нм с термостатированием на 25 °С.

Ход работы:

1. Приготовить реакционную смесь из расчета 170 мкл буфера и 20 мкл субстрата на реакцию, перемешать.

Все пробы готовятся в 3 повторях.

2. Внести по 190 мкл реакционной смеси в ячейки планшета, поместить планшет в термостат на 25 °С.

3. В ячейки, содержащие реакционную смесь, внести:
 - а. 10 мкл буфера в ячейки с холостой пробой (blank);
 - б. 10 мкл раствора эластазы в контрольные ячейки;
 - в. 10 мкл внеклеточных супернатантов или клеточных лизатов в ячейки с образцами;
4. Аккуратно перемешать содержимое планшета на шейкере;
5. Перенести планшет в спектрофотометр, измерять оптическую плотность при 410 нм в течение 5 мин с интервалом 30-60 с.
6. Определить скорость реакции ($V = \Delta A_{410} / \text{мин}$).
7. Рассчитать активность фермента (ед./мл) по формуле:

$$\frac{V_{\text{обр}} - V_{\text{хол}}}{8,8}$$

$V_{\text{обр}}$ – скорость реакции в образце, $V_{\text{хол}}$ – скорость реакции в холостой пробе, 8,8 – коэффициент экстинкции рНА.

3.5. Исследование внеклеточных ловушек нейтрофилов

Нейтрофильные внеклеточные ловушки (НВЛ) – нити ДНК клетки, которые выбрасываются наружу и удерживают патогены. НВЛ состоят из деконденсированного хроматина, связанного с цитоплазматическими белками и белками гранул.

Для визуализации НВЛ окрашивают красителем ДНК, который не проникает через мембрану интактных клеток, например, пропидия йодидом или SYTOX (ThermoFisher Scientific, США), затем исследуют при помощи микроскопа. На основании этой методики также были разработаны протоколы прижизненной оценки НВЛ у мышей. Флуориметрия используется для оценки содержания двуцепочечной ДНК в супернатантах культивируемых клеток с применением красителя PicoGreen [129]. Для НВЛ не обнаружено специфических белков, но НВЛ можно определять по колокализации нескольких белков цитоплазмы и гранул, например, МПО, эластазы и гистонов [4]. В некоторых случаях исследование белков даёт лучший результат, поскольку катионные белки НВЛ могут ингибировать связывание флуоресцентного красителя с ДНК ловушек.

Нейтрофилы способны к выбросу НВЛ только после адгезии, поэтому исследование нетоза проводится на прикрепленных клетках. Нейтрофилы довольно легко прикрепляются к любому субстрату, особенно если в среде содержатся двухвалентные катионы, кальций и магний. Для усиления адгезии можно провести предварительную подготовку поверхности, например, коллагеном или фибронектином.

3.5.1. Флуориметрический анализ НВЛ

Материалы и оборудование:

1. Суспензия изолированных клеток с концентрацией $0,05 \times 10^6$ кл/мл в RPMI-1640 без фенолового красного с 1% ЭБС;
2. RPMI-1640 без фенолового красного с 1% ЭБС;
3. Раствор ЛПС 2 мг/мл в ФСБ;
4. Раствор PicoGreen;
5. Планшет для флуориметрии 96-луночный;
6. Автоматические пипетки с наконечниками;
7. CO₂-инкубатор для культур клеток;
8. Планшетный флуориметр.

Ход работы:

1. Добавить в ячейки планшета по 200 мкл суспензии изолированных клеток.

Образцы, в том числе контрольные, должны занимать не более 1/2 планшета. При исследовании модулирующего вещества добавить его в ячейку планшета вместе с клетками.

2. Инкубировать не менее 20 мин при 37 °С и 5% CO₂.
3. Добавить ЛПС в ячейки с образцами (конечная концентрация 2-200 мкг/мл); в контрольные ячейки добавить соответствующее количество ФСБ.
4. Инкубировать 6 часов при 37 °С и 5% CO₂.
5. Перенести 100 мкл супернатанта в свободные ячейки планшета.
6. Добавить краситель PicoGreen в соответствии с инструкцией производителя в ячейки с клетками и супернатантом.

В ячейках с клетками определяется количество НВЛ, связанных с клетками, в ячейках с супернатантом – свободных НВЛ.

7. Установить режим детекции: длина волны возбуждения 480 нм, эмиссии – 520 нм. Перенести планшет в прибор и провести измерение.

8. Оценить количество НВЛ в стимулированных клетках по отношению к интактным (контрольным) клеткам.

3.5.2. Визуализация НВЛ при помощи флуоресцентной микроскопии

Материалы и оборудование:

1. Суспензия изолированных клеток с концентрацией $0,05 \times 10^6$ кл/мл в RPMI-1640 без фенолового красного с 1% ЭБС;
2. RPMI-1640 без фенолового красного с 1% ЭБС;
3. Раствор ЛПС 2 мг/мл в ФСБ;
4. Раствор SYTOX green 5 мМ в ДМСО;
5. Планшет для микроскопии с оптически прозрачным дном 96-луночный;
6. Автоматические пипетки с наконечниками;
7. CO₂-инкубатор для культур клеток;
8. Планшетный флуориметр.

Ход работы:

1. Провести посев и активацию клеток аналогично разделу 3.5.1 п. 1-4.
2. Промыть лунки два раза RPMI-1640 без фенолового красного с 1% ЭБС.
3. Добавить в лунки 10 нМ–1 мкМ SYTOX green, инкубировать не менее 10 мин.
4. Провести съемку при длине волны возбуждения 500 и эмиссии 520 нм.
5. Оценить количество НВЛ в интактных и активированных образцах.

Справочная информация

Таблица 6

**Флуоресцентные зонды для определения АФК
и их производные**

Зонд	Тип АФК, особенности использования	Длина волны возбуждения и эмиссии, нм
CellROX Orange	В цитоплазме живых клеток	545/565
CellROX Green	В цитоплазме и митохондриях живых клеток; выдерживает фиксацию формалином; может связываться с ДНК	485/520
CellROX Deep Red	В живых клетках; можно использовать в средах с добавлением сыворотки	644/665
Dihydrorhodamine-123	В митохондриях живых клеток	510/540
OxyBURST Green H2DCFDA succinimidyl ester	В живых клетках; при конъюгации с частицами может использоваться для оценки АФК внутри фагосом или других везикул	490/525
CM-H2DCFDA	В живых клетках; проникает через мембрану, окисление красителя дает продукт, который надолго задерживается в клетке, позволяя проводить длительные эксперименты.	490/525
Carboxy-H2DFFDA	В живых клетках; проникает через мембрану, фотостабилен.	490/525
Di(Acetoxyethyl Ester) (6-Carboxy-2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate)	В живых клетках; проникает через мембрану	490/525

Dihydroethidium	в живых клетках; связываясь с АФК, дает яркое голубое свечение, при связывании с ДНК дает красное свечение.	500/600
BODIPY 665/676	Пероксильные радикалы	665/676
BODIPY 581/591 C11 undecanoic acid	В живых клетках и мембранах; при окислении полиненасыщенной бутадениловой части красителя идет смещение пика эмиссии с ~590 нм на ~510 нм	581/591
Singlet Oxygen Sensor Green	Оценка количества синглетного кислорода. Светится слабым голубым светом, в присутствии синглетного кислорода свечение становится зеленым. Не проникает через мембрану	504/525
APF (Aminophenyl fluorescein)	Взаимодействует с гидроксил радикалом, гипохлорит анионом и пероксинитритом.	490/515 нм
MitoSOX Red Mitochondrial Superoxide Indicator	Супероксид анион. Проникает через мембраны и накапливается в митохондриях. Окисленный продукт может связываться с ДНК, при этом дает яркое свечение.	510/580 нм
DPPP (diphenyl-1-Pyrenylphosphine)	Оценка количества гидроперекисей в липидах, сыворотке, тканях	359/382 нм
DAF-FM Diacetate	Свечение возникает только после реакции с NO и образования флуоресцентного продукта бензотриазола	495/515 нм

Основные поверхностные маркеры гранулоцитов

Обозначение в CD-номенклатуре	Альтернативные обозначения	Функция
CD11a	LFA-1 α , Integrin α L	Взаимодействие лейкоцитов с клетками эндотелия
CD11b	Integrin α M, CR3, Mo1, C3niR, Mac-1	Адгезия лейкоцитов
CD11c	Integrin α X, p150,95, AXb2, CR4	Взаимодействие лейкоцитов при реализации воспалительной реакции
CD13	ANPEP, AAP, APM, LAP1, P150, PEPN, APN, gp150, EC 3.4.11.2	Аминопептидаза, мембранная металлопротеиназа, участвует в инвазии клеток и презентации антигена
CD14		Рецептор ЛПС
CD15	X-Hapten, Lewis X, SSEA-1, 3-FAL, FUT4	Селектин-опосредованная активация лейкоцитов
CD16a	FCRIIA	Низкоаффинный FcR, отвечает за фагоцитоз
CD16b	FCRIIB	Трансэндотелиальная миграция лейкоцитов
CD17	LacCer	Связывание бактерий, адгезия, фагоцитоз
CD18	Integrin β 2	Адгезия
CD23	FceRII, B6, BLAST-2, Leu-20	Участвует в продукции IgE, активации лимфоцитов
CD24	BBA-1, HSA	Регуляция адгезии
CD29	Platelet GPIIa, Integrin β 1, GP	Адгезия
CD31	PECAM-1, endoCAM, PECA1	Адгезия, миграция, активация клеток

Продолжение таблицы 7

Обозначение в CD-номенклатуре	Альтернативные обозначения	Функция
CD32a	FC γ RII, Fc- γ receptor 2, FCGR2A	Низкоаффинный FcR, участвует в фагоцитозе
CD32b	FCG2, FCGR2B, IGFR2	Рецептор Fc, участвует в фагоцитозе
CD32c	FCG2, FCGR2C, IGFR2	Рецептор Fc, участвует в фагоцитозе
CD35	CR1, C3b/C4b receptor	Рецептор комплемента
CD44	ECMII, H-CAM, Pgp-1	Адгезия и миграция
CD45	LCA, T200, B220, Ly5, PTPRC	Регуляция роста и дифференцировки
CD46	MCP, TRA2.10	Ингибиторный рецептор комплемента
CD50	ICAM-3	Адгезия
CD58	LFA-3	Адгезия
CD59	1F5Ag, H19, Protectin, MACIF, MIRL, P-18	Регуляция каскада комплемента
CD60a	GD3	Активация клеток
CD62L	L-Selectin, LAM-1, LECAM-1, MEL-14, Leu8, TQ1	Адгезия
CD63	LIMP, MLA1, gp55, NGA, Granulophysin, TSPAN30, OMA81H, ME491, LAMP-3,	Регулировка роста и подвижности клеток, взаимодействие с интегринами

Продолжение таблицы 7

Обозначение в CD-номенклатуре	Альтернативные обозначения	Функция
CD64a	FcγRI, FcγRIA	Рецептор Fc, участвует в фагоцитозе
CD82	4F9, C33, IA4, KAI1, R2, ST6, SAR2, GR15	Активация клеток через TCR
CD85G	LILRA4, ILT7, MGC129597, MGC129598	Активация эозинофилов
CD88	C5R1, C5aR, C5AR, C5A	Рецептор C5a, запускает хемотаксис, дегрануляцию и продукцию АФК
CD89	FCAR	Рецептор Fc региона IgA
CD93	C1QR1, C1qRP, MXRA4, C1qR(P), Dj737e23.1, GR11	Адгезия, уничтожение апоптотических клеток
CD97	TM&LN1, BL-KDD/F12	Адгезия и последующая активация лейкоцитов
CD107a	LAMP-1, LAMPA, CD107a, LGP120	Селектин-опосредованная адгезия
CD107b	LAMP-2, LAMPB	Адгезия лизосом
CD114	CSF3R, G-CSFR, HG-CSFR	Пролиферация и дифференцировка нейтрофилов
CD115	c-fms, CSF-1R, M-CSFR, FIM2, FMS	Пролиферация и дифференцировка нейтрофилов и макрофагов
CD116	GM-CSFR α , CDw116, CSF2R	Пролиферация и дифференцировка нейтрофилов и макрофагов
CD119	IFN γ R, IFN γ Ra	Рецептор ИФН-гамма
CD120a, CD120b		Рецепторы ФНО-альфа
CD123	CD123, IL3R, IL3RAY, IL3RX	Альфа-субъединица рецептора ИЛ-3

Продолжение таблицы 7

Обозначение в CD-номенклатуре	Альтернативные обозначения	Функция
CD125	IL-5R α	Альфа-субъединица рецептора ИЛ-5
CD130	gp130, IL6ST, IL6- β	Субъединица рецептора ИЛ-6
CD131	CSF2RB, IL3RB, IL5RB, CDw131	Бета-субъединица рецепторов ИЛ
CD132	IL-2R γ	Гамма-субъединица рецептора ИЛ-2
CD162	PSGL-1	Качение лейкоцитов по стенке сосуда
CD177	NB1, HNA-2a, NB1gp, PRV1	Трансмиграция нейтрофилов
CD181	CD128a, CXCR1, IL-8R α	Альфа-субъединица рецептора ИЛ-8, хемотаксис
CD182	CD128b, CXCR2, IL-8R β , CMKAR2, IL8R2	Бета-субъединица рецептора ИЛ-8, хемотаксис
CD183	CXCR3, GPR9, CKR-L2, MKAR3, IP10, Mig-R, TAC	Рецептор хемокинов, адгезия и хемотаксис
CD192	CCR2, CKR2, CCR2A, CCR2B, CKR2A, CMKBR2, MCP-1-R	Рецептор MCP-1, адгезия и хемотаксис
CD193	CCR3, CKR3, CMKBR3, CC-CKR-3	Рецептор хемокинов, адгезия
CD195	CCR5, CMKBR5, IDDM22, CC-CKR-5, FLJ78003	Активация, хемотаксис, трансэндотелиальная миграция
CD217	IL-17R, CDw217	Рецептор ИЛ-17
CD218a, CD218b		Рецептор ИЛ-18
CD220	INSR, IR	Рецептор инсулина

Продолжение таблицы 7

Обозначение в CD-номенклатуре	Альтернативные обозначения	Функция
CD281	TIL, CD281, rsc786, TIL. LPRS5, TLR1	Распознавание патогена и активация врожденного иммунитета
CD282	TIL4, CD282, TLR2	Распознавание патогена и активация врожденного иммунитета, иммунный ответ против грамположительных бактерий
CD289	TLR9, TOLL-like receptor 9	Распознавание патогена и активация врожденного иммунитета
CD290	TLR10, TOLL-like receptor 10	Распознавание патогена и активация врожденного иммунитета
CD294	CRTH2, PGRD2, GPR44, DL1R, DP2	Рецептор простагландина D2, участвует в хемотаксисе эозинофилов
CD295	LEPR, OBR	Рецептор лептина
CD302	DCL1	Адгезия, миграция, фагоцитоз
CD321	JAM1, F11 receptor	Межклеточные взаимодействия, трансмиграция
CD354	TREM1	Стимуляция иммунного ответа нейтрофилов и макрофагов

Благодарность. Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства (ПРИОРИТЕТ-2030) Казанского (Приволжского) федерального университета.

ЛИТЕРАТУРА

1. Janeway, C. A. Principles of innate and adaptive immunity / C. A. Janeway, Travers P., Walport M., et. al. // Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. – New York: Garland Science, 2001.

2. Auffray, C. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells / C. Auffray, M. H. Sieweke, F. Geissmann // Annual review of immunology. – 2009. – Т. 27.

3. Dale, D.C. The phagocytes: neutrophils and monocytes / D. C. Dale, L. Boxer, W. C. Liles // Blood. – 2008. – Т. 112, № 4. – С. 935-945.

4. Neutrophil methods and protocols / ред. М. Т. Quinn, F. R. DeLeo, G. M. Bokoch. - Totowa, NJ : Humana Press, 2007. – Т. 412.

5. Jones, H. R. The role of neutrophils in inflammation resolution / H. R. Jones, C. T. Robb, M. Perretti, A. G. Rossi // Semin Immunol. – 2016. – Т. 28, № 2. – С. 137-145.

6. Mayadas, T. N. The multifaceted functions of neutrophils / T. N. Mayadas, X. Cullere, C. A. Lowell // Annu Rev Pathol. – 2014. – Т. 9. – С. 181-218.

7. Wright, H. L. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases / H. L. Wright, R. J. Moots, R. C. Bucknall, S. W. Edwards // Rheumatology (Oxford). – 2010. – Т. 49, № 9. – С. 1618-1631.

8. Borregaard, N. Neutrophils, from marrow to microbes / N. Borregaard // Immunity. – 2010. – Т. 33, № 5. – С. 657-670.

9. Winkler, I. G. Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs / I. G. Winkler, N. A. Sims, A. R. Pettit, V. Barbier, B. Nowlan, F. Helwani, I. J. Poulton, N. van Rooijen, K. A. Alexander, L. J. Raggatt, J. P. Levesque // Blood. – 2010. – Т. 116, № 23. – С. 4815-4828.

10. Dinayer, M. C. Neutrophil Defects and Diagnosis Disorders of Neutrophil Function: An Overview / M. C. Dinayer // Neutrophil. – 2020. – С. 11-29.

11. Kolaczowska, E. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation / E. Kolaczowska, P. Kubes // Nat Rev Immunol. – 2013. – Т. 13, № 3. – С. 159-175.

12. Brinkmann, V. Neutrophil extracellular traps kill bacteria / V. Brinkmann, U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch, A. Zychlinsky // *Science*. – 2004. – T. 303, № 5663. – C. 1532-1535.
13. Metzemaekers, M. Neutrophil chemoattractant receptors in health and disease: double-edged swords / M. Metzemaekers, M. Gouwy, P. Proost // *Cellular & Molecular Immunology*. – 2020. – T. 17, № 5. – C. 433-450.
14. McDonald, B. Intravascular Danger Signals Guide Neutrophils to Sites of Sterile Inflammation / B. McDonald, K. Pittman, G. B. Menezes, S. A. Hirota, I. Slaba, C. C. M. Waterhouse, P. L. Beck, D. A. Muruve, P. Kubes // *Science*. – 2010. – T. 330, № 6002. – C. 362-366.
15. Safronova, V. G. Variations of the effect of insulin on neutrophil respiratory burst. The role of tyrosine kinases and phosphatases / V. G. Safronova, A. G. Gabdoulkhakova, A. V. Miller, I. V. Kosarev, R. N. Vasilenko // *Biochemistry (Mosc)*. – 2001. – T. 66, № 8. – C. 840-849.
16. Ye, R. D. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family / R. D. Ye, F. Boulay, J. M. Wang, C. Dahlgren, C. Gerard, M. Parmentier, C. N. Serhan, P. M. Murphy // *Pharmacol Rev*. – 2009. – T. 61, № 2. – C. 119-161.
17. Brown, S. L. Activation and regulation of platelet-activating factor receptor: role of G(i) and G(q) in receptor-mediated chemotactic, cytotoxic, and cross-regulatory signals / S. L. Brown, V. R. Jala, S. K. Raghuwanshi, M. W. Nasser, B. Haribabu, R. M. Richardson // *J Immunol*. – 2006. – T. 177, № 5. – C. 3242-3249.
18. Mocsai, A. Kinase pathways in chemoattractant-induced degranulation of neutrophils: the role of p38 mitogen-activated protein kinase activated by Src family kinases / A. Mocsai, Z. Jakus, T. Vantus, G. Berton, C. A. Lowell, E. Ligeti // *J Immunol*. – 2000. – T. 164, № 8. – C. 4321-4331.
19. Futosi, K. Reprint of Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways / K. Futosi, S. Fodor, A. Mocsai // *Int Immunopharmacol*. – 2013. – T. 17, № 4. – C. 1185-1197.
20. Petri, B. Neutrophil chemotaxis / B. Petri, M. J. Sanz // *Cell Tissue Res*. – 2018. – T. 371, № 3. – C. 425-436.
21. Gurevich, V. V. GPCR Signaling Regulation: The Role of GRKs and Arrestins / V. V. Gurevich, E. V. Gurevich // *Front Pharmacol*. – 2019. – T. 10. – C. 125.
22. Blackwood, R. A. Unidirectional heterologous receptor desensitization between both the fMLP and C5a receptor and the IL-8 receptor / R. A. Blackwood,

K. T. Hartiala, E. E. Kwoh, A. T. Transue, R. C. Brower // *J Leukoc Biol.* – 1996. – T. 60, № 1. – C. 88-93.

23. Sogawa, Y. Inhibition of neutrophil migration in mice by mouse formyl peptide receptors 1 and 2 dual agonist: indication of cross-desensitization in vivo / Y. Sogawa, T. Ohyama, H. Maeda, K. Hirahara // *Immunology.* – 2011. – T. 132, № 3. – C. 441-450.

24. Forsman, H. Reactivation of desensitized formyl peptide receptors by platelet activating factor: a novel receptor cross talk mechanism regulating neutrophil superoxide anion production / H. Forsman, K. Onnheim, E. Andreasson, K. Christenson, A. Karlsson, J. Bylund, C. Dahlgren // *PLoS One.* – 2013. – T. 8, № 3. – C. e60169.

25. Holdfeldt, A. Reactivation of Galphai-coupled formyl peptide receptors is inhibited by Galphaq-selective inhibitors when induced by signals generated by the platelet-activating factor receptor / A. Holdfeldt, A. Dahlstrand Rudin, M. Gabl, Z. Rajabkhani, G. M. Konig, E. Kostenis, C. Dahlgren, H. Forsman // *J Leukoc Biol.* – 2017. – T. 102, № 3. – C. 871-880.

26. Underhill, D. M. Phagocytosis of microbes: complexity in action / D. M. Underhill, A. Ozinsky // *Annu Rev Immunol.* – 2002. – T. 20. – C. 825-852.

27. Futosi, K. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways / K. Futosi, S. Fodor, A. Mocsai // *Int Immunopharmacol.* – 2013. – T. 17, № 3. – C. 638-650.

28. Jakus, Z. Critical role of phospholipase Cgamma2 in integrin and Fc receptor-mediated neutrophil functions and the effector phase of autoimmune arthritis / Z. Jakus, E. Simon, D. Frommhold, M. Sperandio, A. Mocsai // *J Exp Med.* – 2009. – T. 206, № 3. – C. 577-593.

29. Mocsai, A. The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions / A. Mocsai, J. Ruland, V. L. Tybulewicz // *Nat Rev Immunol.* – 2010. – T. 10, № 6. – C. 387-402.

30. Freeman, S. A. Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton / S. A. Freeman, S. Grinstein // *Immunol Rev.* – 2014. – T. 262, № 1. – C. 193-215.

31. Schenten, D. The Control of Adaptive Immune Responses by the Innate Immune System / D. Schenten, R. Medzhitov // *Advances in Immunology, Vol 109.* – 2011. – T. 109. – C. 87-124.

32. Brown, G. D. Immune recognition. A new receptor for beta-glucans / G. D. Brown, S. Gordon // *Nature.* – 2001. – T. 413, № 6851. – C. 36-37.

33. Kennedy, A. D. Dectin-1 promotes fungicidal activity of human neutrophils / A. D. Kennedy, J. A. Willment, D. W. Dorward, D. L. Williams, G. D. Brown, F. R. DeLeo // *Eur J Immunol.* – 2007. – T. 37, № 2. – C. 467-478.
34. Nguyen, G. T. Neutrophils to the ROScue: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance / G. T. Nguyen, E. R. Green, J. Meccas // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2017. – T. 7. – C. 373.
35. El-Benna, J. Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation / J. El-Benna, M. Hurtado-Nedelec, V. Marzaioli, J. C. Marie, M. A. Gougerot-Pocidallo, P. M. Dang // *Immunol Rev.* – 2016. – T. 273, № 1. – C. 180-93.
36. Nauseef, W. M. Biological roles for the NOX family NADPH oxidases / W. M. Nauseef // *J Biol Chem.* – 2008. – T. 283, № 25. – C. 16961-5.
37. Groemping, Y. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective / Y. Groemping, K. Rittinger // *Biochem J.* – 2005. – T. 386, № Pt 3. – C. 401-416.
38. Kleniewska, P. The NADPH Oxidase Family and its Inhibitors / P. Kleniewska, A. Piechota, B. Skibska, A. Goraca // *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis.* – 2012. – T. 60, № 4. – C. 277-294.
39. Raad, H. Regulation of the phagocyte NADPH oxidase activity: phosphorylation of gp91phox/NOX2 by protein kinase C enhances its diaphorase activity and binding to Rac2, p67phox, and p47phox / H. Raad, M. H. Paquet, T. Boussetta, Y. Kroviarski, F. Morel, M. T. Quinn, M. A. Gougerot-Pocidallo, P. M. Dang, J. El-Benna // *FASEB J.* – 2009. – T. 23, № 4. – C. 1011-1022.
40. Stasia, M. J. CYBA encoding p22(phox), the cytochrome b558 alpha polypeptide: gene structure, expression, role and physiopathology / M. J. Stasia // *Gene.* – 2016. – T. 586, № 1. – C. 27-35.
41. Lewis, E. M. Phosphorylation of p22phox on threonine 147 enhances NADPH oxidase activity by promoting p47phox binding / E. M. Lewis, S. Sergeant, B. Ledford, N. Stull, M. C. Dinauer, L. C. McPhail // *J Biol Chem.* – 2010. – T. 285, № 5. – C. 2959-2967.
42. Panday, A. NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies / A. Panday, M. K. Sahoo, D. Osorio, S. Batra // *Cell Mol Immunol.* – 2015. – T. 12, № 1. – C. 5-23.
43. Ellson, C. D. Neutrophils from p40phox^{-/-} mice exhibit severe defects in NADPH oxidase regulation and oxidant-dependent bacterial killing / C. D. Ellson, K. Davidson, G. J. Ferguson, R. O'Connor, L. R. Stephens, P. T. Hawkins // *J Exp Med.* – 2006. – T. 203, № 8. – C. 1927-1937.

44. Kuribayashi, F. The adaptor protein p40(phox) as a positive regulator of the superoxide-producing phagocyte oxidase / F. Kuribayashi, H. Nunoi, K. Wakamatsu, S. Tsunawaki, K. Sato, T. Ito, H. Sumimoto // *EMBO J.* – 2002. – T. 21, № 23. – C. 6312-6320.
45. Nunes, P. Regulation of the NADPH oxidase and associated ion fluxes during phagocytosis / P. Nunes, N. Demareux, M. C. Dinauer // *Traffic.* – 2013. – T. 14, № 11. – C. 1118-1131.
46. Suh, C. I. The phosphoinositide-binding protein p40phox activates the NADPH oxidase during FcγRIIA receptor-induced phagocytosis / C. I. Suh, N. D. Stull, X. J. Li, W. Tian, M. O. Price, S. Grinstein, M. B. Yaffe, S. Atkinson, M. C. Dinauer // *J Exp Med.* – 2006. – T. 203, № 8. – C. 1915-1925.
47. Massenet, C. Effects of p47phox C terminus phosphorylations on binding interactions with p40phox and p67phox. Structural and functional comparison of p40phox and p67phox SH3 domains / C. Massenet, S. Chenavas, C. Cohen-Addad, M. C. Dagher, G. Brandolin, E. Pebay-Peyroula, F. Fieschi // *J Biol Chem.* – 2005. – T. 280, № 14. – C. 13752-61.
48. El-Benna, J. p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases / J. El-Benna, P. M. Dang, M. A. Gougerot-Pocidallo, J. C. Marie, F. Braut-Boucher // *Exp Mol Med.* – 2009. – T. 41, № 4. – C. 217-225.
49. Ago, T. Phosphorylation of p47phox directs phox homology domain from SH3 domain toward phosphoinositides, leading to phagocyte NADPH oxidase activation / T. Ago, F. Kuribayashi, H. Hiroaki, R. Takeya, T. Ito, D. Kohda, H. Sumimoto // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2003. – T. 100, № 8. – C. 4474-4479.
50. El-Benna, J. Cytosolic Guanine-Nucleotide-Binding Protein Rac2 Operates in-Vivo as a Component of the Neutrophil Respiratory Burst Oxidase - Transfer of Rac2 and the Cytosolic Oxidase Components P47(Phox) and P67(Phox) to the Submembranous Actin Cytoskeleton during Oxidase Activation / J. El-Benna, J. M. Ruedi, B. M. Babior // *Journal of Biological Chemistry.* – 1994. – T. 269, № 9. – C. 6729-6734.
51. Cross, A. R. A variant X-linked chronic granulomatous disease patient (X91+) with partially functional cytochrome b / A. R. Cross, P. G. Heyworth, J. Rae, J. T. Curnutte // *J Biol Chem.* – 1995. – T. 270, № 14. – C. 8194-8200.
52. Lapouge, K. Structure of the TPR domain of p67phox in complex with Rac.GTP / K. Lapouge, S. J. Smith, P. A. Walker, S. J. Gamblin, S. J. Smerdon, K. Rittinger // *Mol Cell.* – 2000. – T. 6, № 4. – C. 899-907.

53. Maehara, Y. Role for the first SH3 domain of p67phox in activation of superoxide-producing NADPH oxidases / Y. Maehara, K. Miyano, H. Sumimoto // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2009. – T. 379, № 2. – C. 589-593.
54. Dahan, I. A Cys-Gly-Cys triad in the dehydrogenase region of Nox2 plays a key role in the interaction with p67phox / I. Dahan, S. M. Smith, E. Pick // *J Leukoc Biol.* – 2015. – T. 98, № 5. – C. 859-874.
55. Tlili, A. Stable accumulation of p67phox at the phagosomal membrane and ROS production within the phagosome / A. Tlili, M. Erard, M. C. Faure, X. Baudin, T. Piolot, S. Dupre-Crochet, O. Nusse // *J Leukoc Biol.* – 2012. – T. 91, № 1. – C. 83-95.
56. Li, X. J. A fluorescently tagged C-terminal fragment of p47phox detects NADPH oxidase dynamics during phagocytosis / X. J. Li, W. Tian, N. D. Stull, S. Grinstein, S. Atkinson, M. C. Dinauer // *Mol Biol Cell.* – 2009. – T. 20, № 5. – C. 1520-1532.
57. Faure, M. C. The recruitment of p47(phox) and Rac2G12V at the phagosome is transient and phosphatidylserine dependent / M. C. Faure, J. C. Sulpice, M. Delattre, M. Lavielle, M. Prigent, M. H. Cuif, C. Melchior, E. Tschirhart, O. Nusse, S. Dupre-Crochet // *Biol Cell.* – 2013. – T. 105, № 11. – C. 501-518.
58. Nauseef, W. M. Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase. Protein kinase C promotes cytoskeletal and membrane association of cytosolic oxidase components / W. M. Nauseef, B. D. Volpp, S. McCormick, K. G. Leidal, R. A. Clark // *J Biol Chem.* – 1991. – T. 266, № 9. – C. 5911-5917.
59. Stanley, A. NADPH Oxidase Complex-Derived Reactive Oxygen Species, the Actin Cytoskeleton, and Rho GTPases in Cell Migration / A. Stanley, K. Thompson, A. Hynes, C. Brakebusch, F. Quondamatteo // *Antioxidants & Redox Signaling.* – 2014. – T. 20, № 13. – C. 2026-2042.
60. Tamura, M. Deactivation of neutrophil NADPH oxidase by actin-depolymerizing agents in a cell-free system / M. Tamura, M. Kanno, Y. Endo // *Biochem J.* – 2000. – T. 349, № Pt 1. – C. 369-375.
61. Tamura, M. Identification of an actin-binding site in p47phox an organizer protein of NADPH oxidase / M. Tamura, K. Itoh, H. Akita, K. Takano, S. Oku // *FEBS Lett.* – 2006. – T. 580, № 1. – C. 261-267.
62. Shao, D. Subcellular localisation of the p40phox component of NADPH oxidase involves direct interactions between the Phox homology domain and F-actin / D. Shao, A. W. Segal, L. V. Dekker // *Int J Biochem Cell Biol.* – 2010. – T. 42, № 10. – C. 1736-1743.

63. Winterbourn, C. C. Modeling the reactions of superoxide and myeloperoxidase in the neutrophil phagosome: implications for microbial killing / C. C. Winterbourn, M. B. Hampton, J. H. Livesey, A. J. Kettle // *J Biol Chem.* – 2006. – T. 281, № 52. – C. 39860-9.
64. Green, J. N. Protein chlorination in neutrophil phagosomes and correlation with bacterial killing / J. N. Green, A. J. Kettle, C. C. Winterbourn // *Free Radic Biol Med.* – 2014. – T. 77. – C. 49-56.
65. Dinayer, M. C. Disorders of Neutrophil Function: An Overview / M. C. Dinayer // *Neutrophil Methods and Protocols*, 2nd Edition. – 2014. – T. 1124. – C. 501-515.
66. Burg, N. D. The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity / N. D. Burg, M. H. Pillinger // *Clin Immunol.* – 2001. – T. 99, № 1. – C. 7-17.
67. Dinayer, M. C. Neutrophil Defects and Diagnosis Disorders of Neutrophil Function: An Overview / M. C. Dinayer // *Methods Mol Biol.* – 2020. – T. 2087. – C. 11-29.
68. Matute, J. D. A new genetic subgroup of chronic granulomatous disease with autosomal recessive mutations in p40 phox and selective defects in neutrophil NADPH oxidase activity / J. D. Matute, A. A. Arias, N. A. Wright, I. Wrobel, C. C. Waterhouse, X. J. Li, C. C. Marchal, N. D. Stull, D. B. Lewis, M. Steele, J. D. Kellner, W. Yu, S. O. Meroueh, W. M. Nauseef, M. C. Dinayer // *Blood.* – 2009. – T. 114, № 15. – C. 3309-3315.
69. Cachat, J. Phagocyte NADPH oxidase and specific immunity / J. Cachat, C. Deffert, S. Hugues, K. H. Krause // *Clin Sci (Lond).* – 2015. – T. 128, № 10. – C. 635-648.
70. Vowells, S. J. Genotype-dependent variability in flow cytometric evaluation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase function in patients with chronic granulomatous disease / S. J. Vowells, T. A. Fleisher, S. Sekhsaria, D. W. Alling, T. E. Maguire, H. L. Malech // *J Pediatr.* – 1996. – T. 128, № 1. – C. 104-107.
71. Kuhns, D. B. Residual NADPH oxidase and survival in chronic granulomatous disease / D. B. Kuhns, W. G. Alvord, T. Heller, J. J. Feld, K. M. Pike, B. E. Marciano, G. Uzel, S. S. DeRavin, D. A. Priel, B. P. Soule, K. A. Zarembek, H. L. Malech, S. M. Holland, J. I. Gallin // *N Engl J Med.* – 2010. – T. 363, № 27. – C. 2600-2610.
72. Hoesel, B. The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer / B. Hoesel, J. A. Schmid // *Mol Cancer.* – 2013. – T. 12. – C. 86.

73. Dumler, J. S. Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum* / J. S. Dumler, K. S. Choi, J. C. Garcia-Garcia, N. S. Barat, D. G. Scorpio, J. W. Garyu, D. J. Grab, J. S. Bakken // *Emerg Infect Dis.* – 2005. – T. 11, № 12. – C. 1828-1834.
74. Carlyon, J. A. Repression of *rac2* mRNA expression by *Anaplasma phagocytophila* is essential to the inhibition of superoxide production and bacterial proliferation / J. A. Carlyon, W. T. Chan, J. Galan, D. Roos, E. Fikrig // *Journal of Immunology.* – 2002. – T. 169, № 12. – C. 7009-7018.
75. Mott, J. Effects of *Anaplasma phagocytophila* on NADPH oxidase components in human neutrophils and HL-60 cells / J. Mott, Y. Rikihisa, S. Tsunawaki // *Infect Immun.* – 2002. – T. 70, № 3. – C. 1359-1366.
76. McCaffrey, R. L. Multiple mechanisms of NADPH oxidase inhibition by type A and type B *Francisella tularensis* / R. L. McCaffrey, J. T. Schwartz, S. R. Lindemann, J. G. Moreland, B. W. Buchan, B. D. Jones, L. A. Allen // *J Leukoc Biol.* – 2010. – T. 88, № 4. – C. 791-805.
77. Allen, L. A. H. *Helicobacter pylori* disrupts NADPH oxidase targeting in human neutrophils to induce extracellular superoxide release / L. A. H. Allen, B. R. Beecher, J. T. Lynch, O. V. Rohner, L. M. Wittine // *Journal of Immunology.* – 2005. – T. 174, № 6. – C. 3658-3667.
78. Bagheri, F. Reactive oxygen species-mediated cardiac-reperfusion injury: Mechanisms and therapies / F. Bagheri, V. Khorrami, A. M. Alizadeh, S. Khalighfard, S. Khodayari, H. Khodayari // *Life Sciences.* – 2016. – T. 165. – C. 43-55.
79. Infanger, D. W. NADPH oxidases of the brain: distribution, regulation, and function / D. W. Infanger, R. V. Sharma, R. L. Davisson // *Antioxid Redox Signal.* – 2006. – T. 8, № 9-10. – C. 1583-1596.
80. Hess, J. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings / J. Hess, P. Angel, M. Schorpp-Kistner // *Journal of Cell Science.* – 2004. – T. 117, № 25. – C. 5965-5973.
81. Jiang, L. J. RA-inducible gene-I induction augments STAT1 activation to inhibit leukemia cell proliferation / L. J. Jiang, N. N. Zhang, F. Ding, X. Y. Li, L. Chen, H. X. Zhang, W. Zhang, S. J. Chen, Z. G. Wang, J. M. Li, Z. Chen, J. Zhu // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2011. – T. 108, № 5. – C. 1897-1902.
82. Kim, C. *Rac2* is an essential regulator of neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activation in response to specific signaling pathways / C. Kim, M. C. Dinanuer // *J Immunol.* – 2001. – T. 166, № 2. – C. 1223-32.

83. Bokoch, G. M. Regulation of the phagocyte NADPH oxidase by Rac GTPase / G. M. Bokoch, T. Zhao // *Antioxid Redox Signal.* – 2006. – T. 8, № 9-10. – C. 1533-1548.
84. Gorlach, A. Calcium and ROS: A mutual interplay / A. Gorlach, K. Bertram, S. Hudecova, O. Krizanova // *Redox Biol.* – 2015. – T. 6. – C. 260-271.
85. Heyworth, P. G. Rac translocates independently of the neutrophil NADPH oxidase components p47phox and p67phox. Evidence for its interaction with flavocytochrome b558 / P. G. Heyworth, B. P. Bohl, G. M. Bokoch, J. T. Curnutte // *J Biol Chem.* – 1994. – T. 269, № 49. – C. 30749-52.
86. Kim, C. Impaired NADPH oxidase activity in Rac2-deficient murine neutrophils does not result from defective translocation of p47phox and p67phox and can be rescued by exogenous arachidonic acid / C. Kim, M. C. Dinauer // *J Leukoc Biol.* – 2006. – T. 79, № 1. – C. 223-234.
87. Mollinedo, F. Neutrophil Degranulation, Plasticity, and Cancer Metastasis / F. Mollinedo // *Trends Immunol.* – 2019. – T. 40, № 3. – C. 228-242.
88. P. Lacy, P. Mechanisms of degranulation in neutrophils / P. Lacy // *Allergy Asthma Clin Immunol.* – 2006. – T. 2, № 3. – C. 98-108.
89. Rørvig, S. Ficolin-1 is present in a highly mobilizable subset of human neutrophil granules and associates with the cell surface after stimulation with fMLP / S. Rørvig, C. Honore, L. I. Larsson, S. Ohlsson, C. C. Pedersen, L. C. Jacobsen, J. B. Cowland, P. Garred, N. Borregaard // *Journal of leukocyte biology.* – 2009. – T. 86, № 6. – C. 1439-1449.
90. Amulic, B. Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease / B. Amulic, C. Cazalet, G. L. Hayes, K. D. Metzler, A. Zychlinsky // *Annual Review of Immunology, Vol 30.* – 2012. – T. 30. – C. 459-489.
91. Cowland, J. B. Granulopoiesis and granules of human neutrophils / J. B. Cowland, N. Borregaard // *Immunol Rev.* – 2016. – T. 273, № 1. – C. 11-28.
92. Faurschou, M. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation / M. Faurschou, N. Borregaard // *Microbes Infect.* – 2003. – T. 5, № 14. – C. 1317-27.
93. Borregaard, N. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte / N. Borregaard, J. B. Cowland // *Blood.* – 1997. – T. 89, № 10. – C. 3503-3521.
94. Jog, N. R. The actin cytoskeleton regulates exocytosis of all neutrophil granule subsets / N. R. Jog, M. J. Rane, G. Lominadze, G. C. Luerman, R. A. Ward, K. R. McLeish // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2007. – T. 292, № 5. – C. C1690-1700.

95. Mitchell, T. Primary granule exocytosis in human neutrophils is regulated by Rac-dependent actin remodeling / T. Mitchell, A. Lo, M. R. Logan, P. Lacy, G. Eitzen // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2008. – T. 295, № 5. – C. C1354-65.
96. Markart, P. Comparison of the microbicidal and muramidase activities of mouse lysozyme M and P / P. Markart, N. Faust, T. Graf, C. L. Na, T. E. Weaver, H. T. Akinbi // *Biochemical Journal.* – 2004. – T. 380. – C. 385-392.
97. Nash, J. A. The peptidoglycan-degrading property of lysozyme is not required for bactericidal activity in vivo / J. A. Nash, T. N. Ballard, T. E. Weaver, H. T. Akinbi // *J Immunol.* – 2006. – T. 177, № 1. – C. 519-526.
98. Levay, P. F. Lactoferrin: a general review / P. F. Levay, M. Viljoen // *Haematologica.* – 1995. – T. 80, № 3. – C. 252-267.
99. Corbin, B. D. Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses / B. D. Corbin, E. H. Seeley, A. Raab, J. Feldmann, M. R. Miller, V. J. Torres, K. L. Anderson, B. M. Dattilo, P. M. Dunman, R. Gerads, R. M. Caprioli, W. Nacken, W. J. Chazin, E. P. Skaar // *Science.* – 2008. – T. 319, № 5865. – C. 962-965.
100. Brinkmann, V. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? / V. Brinkmann, A. Zychlinsky // *J Cell Biol.* – 2012. – T. 198, № 5. – C. 773-783.
101. Brinkmann, V. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs / V. Brinkmann, A. Zychlinsky // *Nat Rev Microbiol.* – 2007. – T. 5, № 8. – C. 577-782.
102. Urban, C. F. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans* / C. F. Urban, D. Ermert, M. Schmid, U. Abu-Abed, C. Goosmann, W. Nacken, V. Brinkmann, P. R. Jungblut, A. Zychlinsky // *PLoS Pathog.* – 2009. – T. 5, № 10. – C. e1000639.
103. Neeli, I. Regulation of extracellular chromatin release from neutrophils / I. Neeli, N. Dwivedi, S. Khan, M. Radic // *J Innate Immun.* – 2009. – T. 1, № 3. – C. 194-201.
104. Bianchi, M. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis / M. Bianchi, A. Hakkim, V. Brinkmann, U. Siler, R. A. Seger, A. Zychlinsky, J. Reichenbach // *Blood.* – 2009. – T. 114, № 13. – C. 2619-2622.
105. Metzler, K. D. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity / K. D. Metzler, T. A. Fuchs, W. M. Nauseef, D. Reumaux, J. Roesler, I. Schulze, V. Wahn, V. Papayannopoulos, A. Zychlinsky // *Blood.* – 2011. – T. 117, № 3. – C. 953-959.

106. Villanueva, E. Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus / E. Villanueva, S. Yalavarthi, C. C. Berthier, J. B. Hodgins, R. Khandpur, A. M. Lin, C. J. Rubin, W. Zhao, S. H. Olsen, M. Klinker, D. Shealy, M. F. Denny, J. Plumas, L. Chaperot, M. Kretzler, A. T. Bruce, M. J. Kaplan // *J Immunol.* – 2011. – T. 187, № 1. – C. 538-552.

107. Marcos, V. CXCR2 mediates NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation in cystic fibrosis airway inflammation / V. Marcos, Z. Zhou, A. O. Yildirim, A. Bohla, A. Hector, L. Vitkov, E. M. Wiedenbauer, W. D. Krautgartner, W. Stoiber, B. H. Belohradsky, N. Rieber, M. Kormann, B. Koller, A. Roscher, D. Roos, M. Griese, O. Eickelberg, G. Doring, M. A. Mall, D. Hartl // *Nat Med.* – 2010. – T. 16, № 9. – C. 1018-1023.

108. Birnie, G.D. The HL60 cell line: a model system for studying human myeloid cell differentiation / G. D. Birnie // *Br J Cancer Suppl.* – 1988. – T. 9. – C. 41-45.

109. Boxio, R. Mouse bone marrow contains large numbers of functionally competent neutrophils / R. Boxio, C. Bossenmeyer-Pourie, N. Steinckwich, C. Dournon, O. Nusse // *J Leukoc Biol.* – 2004. – T. 75, № 4. – C. 604-611.

110. Berkow, R. L. Purification and functional evaluation of mature neutrophils from human bone marrow / R. L. Berkow, R. W. Dodson // *Blood.* – 1986. – T. 68, № 4. – C. 853-860.

111. Marchi, L. F. Comparison of four methods for the isolation of murine blood neutrophils with respect to the release of reactive oxygen and nitrogen species and the expression of immunological receptors / L. F. Marchi, R. Sesti-Costa, S. Chedraoui-Silva, B. Mantovani // *Comparative Clinical Pathology.* – 2014. – T. 23, № 5. – C. 1469-1476.

112. Zhou, L. Impact of human granulocyte and monocyte isolation procedures on functional studies / L. Zhou, R. Somasundaram, R. F. Nederhof, G. Dijkstra, K. N. Faber, M. P. Peppelenbosch, G. M. Fuhler // *Clin Vaccine Immunol.* – 2012. – T. 19, № 7. – C. 1065-1074.

113. Graham, J. M. Separation of human monocytes from a leukocyte-rich plasma / J. M. Graham // *ScientificWorldJournal.* – 2002. – T. 2. – C. 1646-1649.

114. Graham, J. M. Separation of monocytes from whole human blood / J. M. Graham // *ScientificWorldJournal.* – 2002. – T. 2. – C. 1540-1543.

115. Zola, H. Leukocyte and stromal cell molecules: the CD markers. / H. Zola, B. Swart, I. Nicholson, E. Voss. - John Wiley & Sons, 2007.

116. Cano, P. M. A real-time assay for neutrophil chemotaxis / P. M. Cano, A. Vargas, J. P. Lavoie // *Biotechniques*. – 2016. – Т. 60, № 5. – С. 245-251.
117. Nuzzi, P. A. Analysis of Neutrophil Chemotaxis / P. A. Nuzzi, M. A. Lokuta, A. Huttenlocher // *Adhesion Protein Protocols* – Totowa, NJ: Humana Press, 2007. – С. 23-35.
118. Владимиров, Ю. А. Активированная хемилюминесценция и биолюминесценция как инструмент в медико-биологических исследованиях / Ю. А. Владимиров // *Соросовский образовательный журнал*. – 2001. – Т. 7, № 1. – С. 16-23.
119. Владимиров, Ю. А. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция / Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурнина // *Успехи биологической химии*. – 2009. – Т. 49. – С. 341-388.
120. Balaiya, S. An In vitro Assay to Quantify Nitrosative Component of Oxidative Stress / S. Balaiya, K. V. Chalam // *J Mol Genet Med*. – 2014. – Т. 8, № 3.
121. Freeman, R. Technique for the performance of the nitro-blue tetrazolium (NBT) test / R. Freeman, B. King // *J Clin Pathol*. – 1972. – Т. 25, № 10. – С. 912-914.
122. Park, B. H. Infection and nitroblue-tetrazolium reduction by neutrophils. A diagnostic acid / B. H. Park, S. M. Fikrig, E. M. Smithwick // *Lancet*. – 1968. – Т. 2, № 7567. – С. 532-534.
123. Хемилюминесценция при автоокислении люминола в диметилсульфоксиде. Кинетические эффекты щелочей, тушение нитросиним тетразолием и снятие тушения пероксидом водорода / Ю. Б. Цаплев, А. В. Трофимов // *Журнал физической химии*. – 2020. – Т. 94, № 11. – С. 7.
124. Riazanski, V. TRPC6 channel translocation into phagosomal membrane augments phagosomal function / V. Riazanski, A. G. Gabdoulkhakova, L. S. Boynton, R. R. Eguchi, L. V. Deriy, D. K. Hogarth, N. Loaec, N. Oumata, H. Galons, M. E. Brown, P. Shevchenko, A. J. Gallan, S. G. Yoo, A. P. Naren, M. L. Villereal, D. W. Beacham, V. P. Bindokas, L. Birnbaumer, L. Meijer, D. J. Nelson // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2015. – Т. 112, № 47. – С. E6486-95.
125. Riazanski, V. Kinetic Separation of Oxidative and Non-oxidative Metabolism in Single Phagosomes from Alveolar Macrophages: Impact on Bacterial Killing / V. Riazanski, Z. Sui, D. J. Nelson // *iScience*. – 2020. – Т. 23, № 11. – С. 101759.
126. El-Benna, J. Analysis of Protein Phosphorylation in Human Neutrophils / J. El-Benna, P. M.-C. Dang // *Neutrophil Methods and Protocols* – Totowa, NJ: Humana Press, 2007. – С. 85-96.

127. Lee, W. L. Leukocyte elastase: physiological functions and role in acute lung injury / W. L. Lee, G. P. Downey // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2001. – T. 164, № 5. – С. 896-904.

128. Ndlovu, G. In vitro determination of the anti-aging potential of four southern African medicinal plants / G. Ndlovu, G. Fouche, M. Tselanyane, W. Cordier, V. Steenkamp // *BMC Complement Altern Med.* – 2013. – T. 13. – С. 304.

129. Tanaka, K. In vivo characterization of neutrophil extracellular traps in various organs of a murine sepsis model / K. Tanaka, Y. Koike, T. Shimura, M. Okigami, S. Ide, Y. Toiyama, Y. Okugawa, Y. Inoue, T. Araki, K. Uchida, Y. Mohri, A. Mizoguchi, M. Kusunoki // *PLoS One.* – 2014. – T. 9, № 11. – С. e111888.

*Электронное учебное издание
сетевого распространения*

**Филина Юлия Викторовна
Мифтахова Регина Рифкатовна
Киямова Рамзия Галлямовна
Габдулхакова Аида Габдрахмановна**

**КЛЕТКИ ВРОЖДЕННОЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ:
МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЦЕНКИ
ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ**

Учебное пособие

Подписано к использованию 19.03.2024.

Гарнитура «Times New Roman».

Заказ 109/3.

Издательство Казанского университета

420008, г. Казань, ул. Профессора Нужина, 1/37
тел. (843) 206-52-14 (1704), 206-52-14 (1705)