

**Московский государственный университет имени
М. В. Ломоносова**

**Научно-исследовательский институт физико-химической
биологии имени А. Н. Белозерского**

На правах рукописи

Приходько Анастасия Сергеевна

**РОЛЬ МИТОХОНДРИЙ В ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ
АКТИВАЦИИ И АПОПТОЗЕ НЕЙТРОФИЛОВ ЧЕЛОВЕКА**

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

к.б.н., Зиновкин Р.А.

Москва - 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	8
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1. Строение нейтрофилов.....	12
1.1. Рецепторы нейтрофилов	14
2. Активация нейтрофилов.....	17
2.1. Миграция нейтрофилов через эндотелий	17
2.2. Фагоцитоз.....	20
2.3. Окислительный взрыв.....	21
2.4. Дегрануляция.....	24
2.5. Образование внеклеточных ловушек (нетоз).....	26
3. Апоптоз нейтрофилов.....	28
3.1. Спонтанный апоптоз (внутренний путь)	29
3.2. Индуцируемый апоптоз нейтрофилов (внешний путь).....	32
3.3. Регуляция апоптоза	35
4. Роль активных форм кислорода в физиологии нейтрофилов.....	37
4.1 Активные формы кислорода и нетоз.....	38
4.2. Активные формы кислорода и апоптоз.....	39
5. Митохондрии как активаторы воспалительного ответа	42
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	45
3.1. Клеточные культуры.	46
3.1.1. Выделение нейтрофилов	46
3.1.2. Эндотелиальные клетки линии EA.hy926.....	47
3.2. Выделение компонентов митохондрий (митохондриальных образов опасности).....	47
3.3. Выделение митохондриальной ДНК и оценка чистоты.....	48
3.4. Выделение ядерной ДНК и оценка чистоты	48
3.5. Вестерн-блот	48

3.6. Зимография.....	49
3.7. Определение уровня активности каспазы-3.....	49
3.8. Выделение РНК из клеток линии EA.hy 926 и обратная транскрипция	49
3.9. ПЦР в реальном времени	50
3.10. Флуоресцентная микроскопия.....	51
3.11. Определение внутриклеточной продукция активных форм кислорода.....	51
3.12. Оценка уровня апоптоз нейтрофилов	52
3.12.1. Определение уровня апоптоза проточной цитофлуориметрией	52
3.12.2. Оценка морфологии ядер	52
3.13. Оценка степени дегрануляции нейтрофилов (секреторной активности).....	52
3.14. Статистическая обработка данных.....	53
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	54
4.1. Митохондриальная ДНК как индуктор провоспалительной активации нейтрофилов	54
4.1.1. Компоненты митохондрий вызывают провоспалительную активацию нейтрофилов человека и снижают уровень их апоптоза.....	54
4.1.2. Очищенная митохондриальная ДНК не вызывает провоспалительную активацию нейтрофилов	56
4.1.3 Праймирование нейтрофилов с помощью GM-CSF вызывает провоспалительную активацию под действием митохондриальной ДНК	59
4.1.4. Механизм действия внеклеточной ДНК на нейтрофилы человека связан с TLR9	64
4.1.5. Митохондриальная ДНК не увеличивает экспрессию молекул адгезии в эндотелиальных клетках.....	68
4.1.6. Подведение итогов главы 4.1	70
4.2. Митохондриальные активные формы кислорода в жизнедеятельности нейтрофилов	72
4.2.1. Митохондриально-направленные антиоксиданты семейства SkQ специфично накапливаются в митохондриях нейтрофилов человека.....	72

4.2.2. Снижение уровня мТАФК уменьшает общее количество АФК активированных нейтрофилов человека	74
4.2.3. Снижение уровня мТАФК уменьшает активацию нейтрофилов.....	76
4.2.4. Снижение уровня мТАФК увеличивает уровень апоптоза нейтрофилов человека	78
4.2.5. Снижение уровня мТАФК связано с уменьшением фосфорилирования MAP-киназ p38 и ERK1/2	82
4.2.6. Подведение итогов главы 4.2	85
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	88
ВЫВОДЫ	90
БЛАГОДАРНОСТИ	91
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	92

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

AP-1 — Activator protein 1, транскрипционный фактор

Araf-1 — Apoptotic peptidase activating factor 1, апоптотический протеаза-активирующий фактор-1

BPI — Bactericidal/permeability-increasing protein; белок, увеличивающий проницаемость

C₁₂TRP — додецилтрифенилфосфоний

DAMPs — Damage-associated molecular patterns, образы опасности ассоциированные с повреждением

DCF — 2',7'-дихлорфлуоресцеин

DMEM — Dulbecco's Modified Eagle's Medium, модифицированная по способу Дульбекко среда Игла

DPI — дифенилениодония хлорид

DTT — дитиотреитол

FBS — Fetal bovine serum, телячья эмбриональная сыворотка

FCCP — карбонилцианид-(4-фторметокси)-фенилгидразон

fMLP — formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine, формил-метионин-лейцин-фенилаланин;

FPR-1 — formyl peptide receptor-1, рецептор формилированных белков;

GM-CSF — Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

ICAM1 — молекула межклеточной адгезии-1

HIF-1 — фактор, индуцируемый гипоксией

MAPK — mitogen-activated protein kinase, митоген-активируемая протеиновая киназа

Mcl-1 — myeloid leukemia cell differentiation protein, антиапоптотический белок нейтрофилов

MitoQ — 10-(6'-убихинол)децилтрифенилфосфоний

MMP-9 — Matrix metalloproteinase 9, Матриксная металлопротеиназа 9;

MyD88 — Myeloid differentiation primary response gene (88), адаптерный белок

NAC — N-ацетил-D-цистеин

NFκB — ядерный транскрипционный фактор «каппа-би»

NLR — Nod-like receptor, Nod-подобный рецептор

PAMPs — pathogen-associated molecular patterns, образы патогенности

PECAM — тромбоцитарно-эндотелиальная молекула адгезии

PI3K — фосфатидилинозитол-3-киназы

PMA — phorbol 12-myristate 13-acetate, форболовый эфир

SkQ1 — 10-(6'-пластохинонил) децилтрифенилфосфоний

SkQR1 — 10-(6'-пластохинолил) децилродамин 19

TLR — Toll-like receptor, Toll-подобный рецептор

TNF — Tumor necrosis factor, фактор некроза опухоли

TRAIL — TNF-related apoptosis-inducing ligand, цитокин семейства факторов некроза опухоли

NETs — Neutrophil extracellular traps, внеклеточные ловушки нейтрофилов

АФК — активные формы кислорода

БСА — бычий сывороточный альбумин

ДМСО — диметилсульфоксид

ДНФ — 2,4 –динитрофенол

КМ — компоненты митохондрий

ЛПС — липополисахарид

МПО — миелопероксидаза

мТАФК — митохондриальные активные формы кислорода

мтДНК — митохондриальная ДНК

НАДФН — никотинамидадениндинуклеотидфосфат

СОД — супероксиддисмутаза

ССВО — синдром системного воспалительного ответа

ЭПС — эндоплазматическая сеть

ядНК — ядерная ДНК

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Воспалительный ответ в организме человека может иметь как инфекционную, так и неинфекционную природу. В первом случае индукторами воспалительной реакции являются так называемые образы опасности, ассоциированные с патогенами или образы патогенности (pathogen-associated molecular patterns; PAMPs), представляющие собой компоненты бактерий или иных патогенов, проникших в организм в ходе заражения. Неинфекционное (стерильное) воспаление возникает в ответ на травмы или другие повреждения, при этом инвазия патогенов не происходит, а индукторами воспалительного ответа служат компоненты разрушенных клеток. Внутриклеточные компоненты, способные приводить к развитию иммунного ответа, называют образам опасности, ассоциированными с повреждением, или эндогенными сигналами опасности (Danger-associated molecular patterns; DAMPs).

Важнейшую роль в распознавании образов опасности обоих типов играют нейтрофилы, клетки врождённого иммунитета. При активации данных лейкоцитов в ответ на различные стимулы развивается воспалительный ответ, вовлекающий другие типы иммунных клеток, а также эндотелий. Эндотелиальные клетки не участвуют в уничтожении патогенов, но обеспечивают дополнительную активацию лейкоцитов и их миграцию к очагу воспаления. В некоторых случаях в ответ на обширные повреждения или тяжёлую инфекцию может возникать избыточный воспалительный ответ, в ходе которого основной урон организму наносят не патогены или травмы, а собственная иммунная система. Такое патологическое состояние называют синдромом системного воспалительного ответа (ССВО); одной из возможных причин его развития считаются компоненты митохондрий, попадающие в кровотоки после разрушения клеток в результате травмы и активирующие клетки иммунной системы – в первую очередь нейтрофилы. Это объясняется тем, что митохондрии являются эволюционными потомками бактерий и сохраняют некоторые черты их организации (кольцевая ДНК с отличным от ядерной профилем метилирования, N-формилированные белки и другие), которые распознаются нейтрофилами как образы опасности. Однако достоверно не установлено, какие из компонентов митохондрий вносят наибольший вклад в активацию нейтрофилов и развитие воспаления.

В норме после уничтожения патогена происходит разрешение воспаления: удаление провоспалительных медиаторов и токсичных противомикробных агентов, восстановление эндотелиального барьера, прекращение миграции лейкоцитов и их элиминация апоптозом.

При ССВО или в ходе хронического воспаления наблюдаются различные нарушения этих процессов, в частности, задержка апоптоза нейтрофилов и эндотелиальная дисфункция. Поиск способов восстановления физиологического уровня апоптоза активированных нейтрофилов остаётся актуальной задачей современной науки. Наиболее перспективным направлением в этой сфере остаются исследования, посвящённые митохондриям нейтрофилов, поскольку участие этих органелл необходимо для развития апоптоза. Кроме того, появляется всё большее количество данных о том, что митохондрии в нейтрофилах не только обеспечивают апоптоз, но и участвуют во множестве других процессов, важных как для развития воспаления, так и для его разрешения.

Степень разработанности темы

Хорошо известно, что во многих типах клеток митохондрии участвуют в развитии апоптоза. У нейтрофилов митохондрий немного и их активность мала, поэтому долгое время их роли в жизни клетки не уделяли должного внимания. Впоследствии оказалось, что митохондрии играют ключевую роль в развитии как спонтанного, так и индуцируемого апоптоза нейтрофилов, поскольку при нарушении целостности митохондриальной мембраны в цитозоль выходят различные факторы, запускающие клеточную смерть (например, цитохром с). Но на данный момент механизмы регуляции этого процесса недостаточно изучены. Особенно противоречивой темой остаётся значение активных форм кислорода, продуцируемых митохондриями нейтрофилов: по одним данным, для активации нейтрофилов имеют значение только активные формы кислорода (АФК), генерируемые НАДФН-оксидазой, но отдельные исследования указывают на возможность митохондриальных АФК регулировать активацию нейтрофилов и, в частности, сборку НАДФН-оксидазы.

В 2010 году было показано, что компоненты митохондрий (КМ), попадающие при травме в кровь, способны вызывать провоспалительную активацию нейтрофилов и клеток эндотелия. Однако до сих пор неясно, какие из компонентов митохондрий ответственны за данную активацию. Некоторые исследователи считают, что основой индуктор воспаления в такой системе - митохондриальная ДНК, которая по строению и профилю метилирования похожа на бактериальную, но это утверждение остаётся спорным.

Цель данной работы – исследование роли митохондрий как индукторов и регуляторов провоспалительной реакции в нейтрофилах и эндотелиальных клетках человека.

Задачи:

1. Изучить влияние компонентов митохондрий на провоспалительную активацию нейтрофилов.
2. Оценить вклад митохондриальной ДНК в активацию нейтрофилов человека, возникающую под действием компонентов митохондрий.
3. Определить механизм действия внеклеточной митохондриальной ДНК на нейтрофилы и эндотелиальные клетки человека.
4. Исследовать влияние митохондриальных активных форм кислорода на апоптоз и активацию нейтрофилов человека.

Методология и методы исследования

В работе используется широкий спектр теоретических и эмпирических методов исследования. К теоретическим относятся индукция, дедукция, сравнительный анализ и другие. Эмпирическая часть включает в себя широко известные методы клеточной и молекулярной биологии, а именно: проточная цитофлуориметрия, флуоресцентная микроскопия, вестерн-блоттинг и другие.

Научная новизна работы

В результате проделанной работы впервые было выявлено, что чистая митохондриальная ДНК не является провоспалительным сигналом (образом опасности) для эндотелиальных клеток и интактных нейтрофилов человека. Также было показано, что для активации в ответ на митохондриальную ДНК нейтрофилам человека требуется праймирование. Кроме того, было продемонстрировано, что в нейтрофилах человека механизм действия митохондриальной ДНК связан с Toll-зависимым рецептором 9 (TLR9). Установлено, что митохондриальные активные формы кислорода играют важную роль в активации и программируемой смерти нейтрофилов человека. Так, было продемонстрировано, что уменьшение митохондриальных АФК с помощью митохондриально-направленных антиоксидантов увеличивает уровень апоптоза нейтрофилов и не вызывает другой вид клеточной смерти. Снижение уровня митохондриальных АФК также уменьшает дегрануляцию нейтрофилов и активацию внутриклеточных провоспалительных каскадов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Компоненты митохондрий могут распознаваться нейтрофилами как образы опасности и вызывать провоспалительную активацию.
2. Митохондриальная ДНК, не содержащая примесей, не вызывает активацию нейтрофилов и эндотелиальных клеток линии Ea.hy926.
3. Только праймированные нейтрофилы человека могут активироваться под действием очищенной мтДНК.
4. Воспалительный эффект мтДНК на нейтрофилы человека связан с TLR9-зависимым путём передачи сигнала.
5. Уменьшение количества митохондриальных АФК увеличивает уровень апоптоза нейтрофилов человека и снижает их провоспалительную активацию.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные результаты вносят весомый вклад в понимание роли митохондрий в активации и программируемой клеточной смерти нейтрофилов человека, что открывает возможности для терапевтического использования митохондриально-направленных антиоксидантов при разных патологических состояниях, сопровождающихся избыточным иммунным ответом.

Личный вклад автора заключался в анализе данных литературы, постановке экспериментов, обработке полученных экспериментальных данных и их интерпретации, а также в участии в подготовке публикаций.

Степень достоверности

Достоверность полученных данных подтверждается большим количеством хорошо воспроизводимых результатов, а также их статистической значимостью.

Апробация работы

Результаты работы были представлены автором на конференциях: 38th FEBS Congress: Mechanisms in Biology (Санкт-Петербург, 2013), 2-ая Международная конференция «Homo sapiens liberatus» (Москва, 2015).

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. Строение нейтрофилов

Воспаление – это комплексная реакция иммунной системы, возникающая в ответ на повреждение или инфекцию и направленная на защиту организма. Типичный воспалительный ответ включает в себя индукторы воспаления, рецепторы, их связывающие, медиаторы воспаления (например, цитокины) и ткани-мишени. Острая воспалительная реакция направлена на нейтрализацию и элиминирование повреждающего фактора и состоит из нескольких стадий: инициация воспаления взаимодействием патогенов с рецепторами иммунных клеток, активация иммунных клеток и амплификация воспалительного сигнала за счёт синтеза медиаторов воспаления, вовлечение эндотелия, уничтожение патогена и, наконец, разрешение воспаления (Medzhitov, 2008).

Важнейшую роль в воспалении играют нейтрофилы – лейкоциты, отвечающие за реализацию врождённого иммунитета. В крови здорового взрослого человека содержится от 2 до 7 млрд нейтрофилов на литр крови, что составляет 60-70% от общего числа лейкоцитов. Нейтрофилы развиваются в красном костном мозге из миелоидной клетки-предшественника, развитие контролируется цитокинами G-CSF (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор), GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор), интерлейкином-3, интерлейкином-6 и некоторыми другими. После созревания нейтрофилы попадают в кровоток, после чего мигрируют в ткани, где через 3-5 суток подвергаются спонтанному апоптозу (Niels Borregaard, 2010).

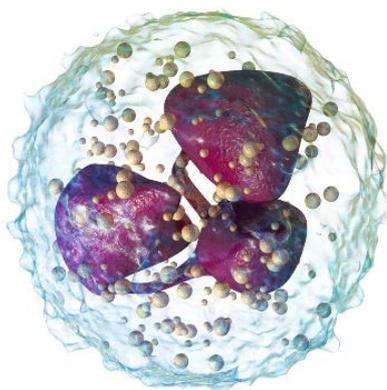


Рис. 1. Схема строения нейтрофила (Baker, Giovannoni, & Schmierer, 2017).

Средний размер нейтрофила человека в суспензии составляет около 9 мкм в диаметре, при распластывании на субстрате, например, при взаимодействии с клетками эндотелия, его

диаметр может увеличиваться до 15 мкм (Niemiec *et al.*, 2015). Значительную часть клетки занимает ядро характерной морфологии: 3-5 сегментов плотно упакованного хроматина, соединённых тонкими перемычками (Рис. 1). Незрелые нейтрофилы, обычно составляющие не более 5% от числа всех лейкоцитов, не имеют такого сегментированного ядра и поэтому называются палочкоядерными.

Зрелые нейтрофилы содержат небольшое количество митохондрий, которые практически не участвуют в синтезе АТФ (Zucker-Franklin, 1968; Borregaard and Herlin, 1982).

Основную энергию нейтрофилы получают из гликолиза, что позволяет им функционировать в условиях острого воспаления, при которых концентрация кислорода очень низка (Edwards, Hallett, & Campbell, 1984). Тем не менее, показано, что митохондрии нейтрофилов обладают мембранным потенциалом, на который влияют разобщители окислительного фосфорилирования, например, FCCP (Fossati *et al.*, 2003).

Также нейтрофилы содержат множество гранул, поэтому их относят к гранулоцитам (зернистым лейкоцитам). Различают 4 основных типа гранул, характеристики которых представлены в таблице 1. Формирование гранул происходит последовательно в процессе дифференцировки нейтрофилов из промиелоцитов (Bainton & Farquhar, 1966). Первичные гранулы, образующиеся из незрелых транспортных везикул аппарата Гольджи, содержат большое количество миелопероксидазы и кислых гидролаз и окрашиваются красителем азуром А. Такие гранулы имеют размеры около 500 нм и называются первичными или азурофильными. На более поздних стадиях созревания нейтрофилов накопление миелопероксидазы прекращается, поэтому остальные гранулы её не содержат. Вторичные (специфические гранулы) имеются уже в палочкоядерных нейтрофилах и содержат большое количество лактоферрина и небольшое – желатиназы. Третичные (желатиновые) гранулы имеются у зрелых сегментоядерных нейтрофилов и, как следует из названия, содержат в основном желатиназу (N. Borregaard, Kjeldsen, Lollike, & Sengeløv, 1995).

Также гранулы отличаются молекулами, входящими в состав их мембран – например, молекулами, называемыми кластерами дифференцировки (cluster of differentiation, CD). Такими CD-молекулами могут быть белки (редко углеводы), служащие рецепторами, лигандами, молекулами клеточной адгезии или ферментами. Вторичные и третичные гранулы и секреторные везикулы содержат интегрины, участвующие в фагоцитозе и клеточной адгезии (CD11b/CD18); их нет в мембранах первичных гранул. Азурофильные гранулы содержат гранулофизин (CD63), который присутствует в лизосомах, но не встречается в остальных типах гранул.

Таблица 1. Гранулы нейтрофилов и их содержимое.

Гранулы	Молекулы мембраны	Состав	Функциональное назначение
Первичные (азурофильные)	CD63 CD68	Миелопероксидаза, катепсин G, эластаза, протеиназа 3, дефензины, кислая фосфатаза, коллагеназа, белок BPI	Внутриклеточное уничтожение бактерий
Вторичные (специфические)	CD11b/CD18 CD66 Рецептор fMLP Рецептор TNF Рецептор фибронектина	NADPH-оксидаза, лактоферрин, лизоцим, транскобаламин II	Внутри- и внеклеточное уничтожение бактерий
Третичные (желатиназные)	CD11b/CD18 Рецептор fMLP	Желатиназа	Обеспечение миграции
Секреторные везикулы	CD10 CD11b/CD18 CD13 CD14 CD16 CD45 Рецептор fMLP	Альбумин, рецепторы комплемента, тетранектин	Поддержание состава мембраны, взаимодействие с другими клетками

1.1. Рецепторы нейтрофилов

Для распознавания разнообразных образов опасности и патогенов нейтрофилы используют множество рецепторов. Их можно разделить на следующие основные группы:

- Рецепторы цитокинов;
- Рецепторы клеточной адгезии;
- Fc-рецепторы;

- Рецепторы, сопряжённые с G-белком;
- Toll-подобные рецепторы (Toll-like receptors, TLRs);
- Nod-подобные рецепторы (Nod-like receptors, NLRs).

В рамках данной работы будут рассматриваться Toll-подобные рецепторы.

Toll-подобные рецепторы (TLR) – это наиболее известные рецепторы врождённого иммунитета, распознающие консервативные молекулярные паттерны патогенов, причём чаще всего узнаются производные липидов (ацил-липopeпиды в случае TLR1, TLR2, TLR6), углеводов (липополисахарид в случае TLR4) и нуклеотидные последовательности (TLR7, TLR8, TLR9) (Табл. 2). Toll-подобные рецепторы экспрессируются как на поверхности клеток, так и на мембранах эндосом в различных клетках (Н. Kumar, Kawai, & Akira, 2009). Всего у человека известно 10 видов Toll-подобных рецепторов, у нейтрофилов представлены все, кроме TLR3 (Hayashi, Means and Luster, 2003; Kumar *et al.*, 2013).

Таблица 2. Toll-подобные рецепторы нейтрофилов и их лиганды

Рецептор	Локализация	Лиганды	Адаптерный белок
TLR1	Клеточная мембрана	Триацил-липopeпиды	MyD88/TIRAP
TLR2	Клеточная мембрана	Пептидогликан, липотейхоевая кислота, диацил- и триацил-липopeпиды, зимозан	MyD88/TIRAP
TLR4	Клеточная мембрана/ мембрана эндосом	Липополисахарид	MyD88/TIRAP/TRIF/TRAM
TLR5	Клеточная мембрана	Флагеллин	MyD88
TLR6	Клеточная мембрана	Диацил-липopeпиды	MyD88/TIRAP
TLR7	Мембрана эндосом	Одноцепочечная РНК	MyD88

TLR8	Мембрана эндосом	Одноцепочечная РНК, G-богатые олигонуклеотиды	MyD88
TLR9	Мембрана эндосом	неметилированные CpG-участки ДНК	MyD88
TLR10	Клеточная мембрана	Неизвестны	MyD88

Toll-подобные рецепторы представляют собой трансмембранные гликопротеиды с внеклеточным доменом, содержащим 20-25 лейцин-богатых повторов, и цитоплазматическим доменом, отвечающим за взаимодействие с адаптерными белками. Внутриклеточную часть рецептора называют TIR-доменом (Toll/IL-1 receptor domain, TIR) из-за его гомологии с внутриклеточной частью рецептора интерлейкина-1 (Bowie & O'Neill, 2000). Неактивные Toll-подобные рецепторы существуют в виде мономеров, после связывания с лигандом и активации обычно димеризуются с образованием гомодимеров, но TLR2 способен образовывать гетеродимеры с TLR1 и TLR6.

Известно 4 адаптерных белка, способных связываться с TIR-доменом и активировать различные внутриклеточные сигнальные пути: MyD88, TRIF, TIRAP (TIR-содержащий адаптерный белок), и TRAM (TRIF-related adaptor molecule). TLR5, TLR7 и TLR9 передают сигнал исключительно через MyD88, а TLR1, TLR2, и TLR6 используют белок TIRAP в дополнение к MyD88 (Takeda & Akira, 2005). Только TLR4 может использовать все 4 адаптерных белка, поэтому липополисахарид, который связывается с данным рецептором, является мощным иммуностимулятором и может вызвать эндотоксиновый шок (Haziot *et al.*, 1996).

Активация MyD88 приводит к фосфорилированию серин-треониновых киназ семейства IRAK (в первую очередь, IRAK4), что запускает различные провоспалительные сигнальные каскады (MAP-киназный каскад, NF-κB путь и другие) (O'Neill & Bowie, 2007). Более подробно данные сигнальные пути будут рассмотрены в разделе «Активация нейтрофилов».

MyD88-независимый путь передаёт сигнал через киназу TBK1 и приводит к активации транскрипционных факторов IRF3 и IRF7, что приводит к продукции интерферонов

первого типа и экспрессии интерферон-зависимых генов. Однако имеются данные, что MyD88-независимый путь не работает в нейтрофилах человека (Tamassia *et al.*, 2007).

2. Активация нейтрофилов

Активация нейтрофилов – одна из стадий развития воспаления, при которой под действием внешних сигналов у нейтрофилов наблюдаются морфологические и физиологические изменения (уплощение, дегрануляция, миграция, секреция цитокинов, окислительный взрыв и другие).

Сигналы, способные вызвать активацию нейтрофилов, делятся на два типа:

- PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns) – патоген-ассоциированные образы опасности (образы патогенности). К ним относятся молекулы, входящие в состав бактерий, вирусов, грибов: например, ЛПС, fMLP и другие;
- DAMPs (Damage-associated molecular patterns) – образы опасности, ассоциированные с повреждением (сигналы эндогенной опасности). Подобные молекулы связаны с так называемым стерильным воспалением, поскольку могут вызывать иммунный ответ в отсутствие патогена. В качестве эндогенных сигналов опасности могут выступать различные молекулы клетки, например, ДНК, АТФ, гликозилированные белки и кардиолипин (Trautmann, 2009) (Farkas, Kilgore, & Lotze, 2007).

Активация нейтрофилов включает в себя 3 типа процессов:

- Миграция в ткани через эндотелий сосудов;
- Уничтожение патогенов (фагоцитоз, нетоз и другие);
- Взаимодействие нейтрофилов с другими типами иммунных клеток.

Такое деление весьма условно, поскольку все эти 3 типа тесно взаимосвязаны и могут происходить одновременно.

2.1. Миграция нейтрофилов через эндотелий

В большинстве тканей миграция нейтрофилов через эндотелиальный барьер включает в себя 4 основных стадии: связывание и качение, активация, плотная адгезия к эндотелию и собственно экстравазация (Muller, 2013). Каждая из стадий определяется взаимодействием

молекул адгезии нейтрофилов и эндотелиальных клеток; экспрессия этих молекул зависит от множества факторов.

Через несколько минут после взаимодействия с провоспалительными сигналами (патогенами, цитокинами и др.) эндотелиальные клетки начинают экспонировать на своей поверхности Р-селектины, секретируемые тельцами Вайбеля-Паладе. Е-селектины, синтезирующиеся *de novo*, появляются на поверхности эндотелия в течение часа (Petri, Phillipson, & Kubes, 2008). Эти селектины связываются со своими лигандами на лейкоцитах (L-селектин, PSGL1 (P-selectin glycoprotein ligand 1), CD44) и обеспечивают захват свободноплавающих в кровотоке нейтрофилов эндотелием (McEver and Cummings, 1997; Katayama *et al.*, 2005). Такое взаимодействие довольно непрочное из-за тока крови и невысокого сродства рецепторов, поэтому нейтрофилы катятся вдоль поверхности сосуда (Рис.2). Для обеспечения плавного и безотрывного качения диссоциация связей Р-селектина и PSGL1 на одном конце нейтрофила сопряжена с образованием таких же связей на другом конце (Schmidtke & Diamond, 2000).

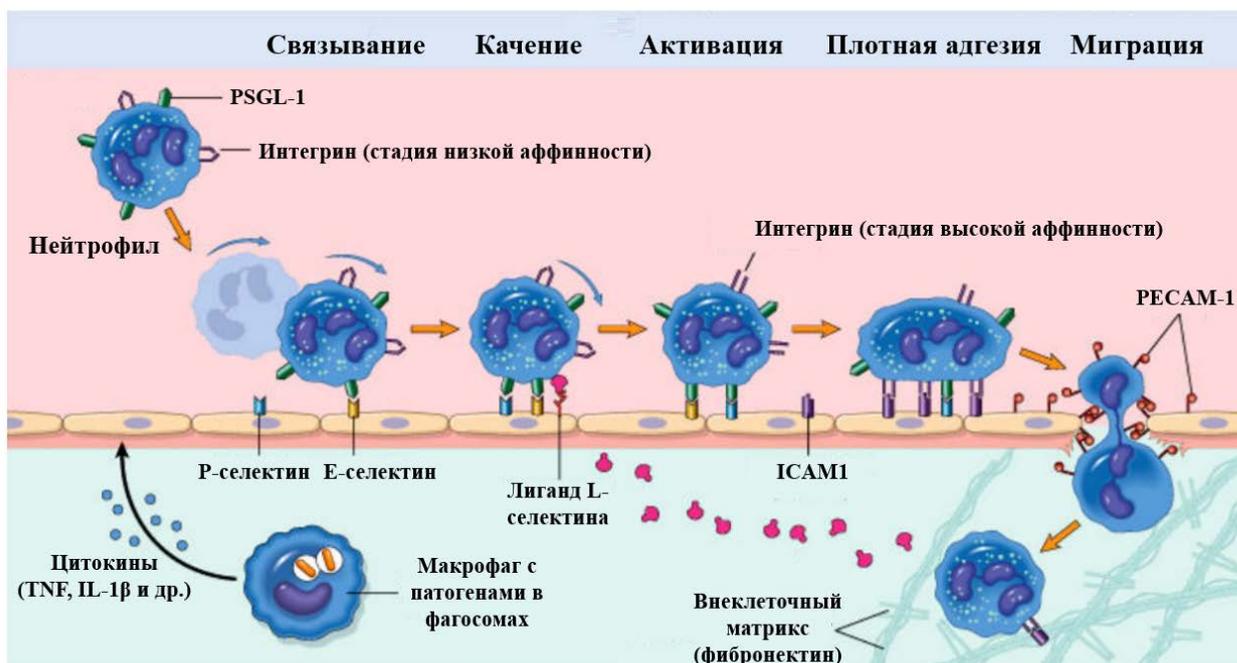


Рис. 2. Стадии миграции нейтрофилов через эндотелий. Адаптировано из (V. Kumar, Fausto, & Abbas, 2005)

Через непродолжительное время нейтрофилы перестают катиться, останавливаются и переходят в стадию плотной адгезии. (Рис. 2). Это связано с тем, что взаимодействие с активированным эндотелием приводит к дополнительной активации нейтрофилов.

Важнейшую роль в этом процессе играют TNF, IL-1 β и хемокины, содержащие ELR-

мотив (к ним относится интерлейкин-8, например) (Sanz & Kubes, 2012). Активация хемокиновых рецепторов в нейтрофилах приводит к конформационным изменениям интегринов LFA1 и Mac-1 (CD11b/CD18), что позволяет им связаться с молекулами клеточной адгезии эндотелия (CAMs), и это вызывает замедление качения (Williams, Azcutia, Newton, Alcaide, & Luscinskas, 2011). Связывание интегринов с их мишенями на эндотелии запускает целый ряд внутриклеточных каскадов, связанных с тирозинкиназами; сигнал такого типа называется сигналом «снаружи-внутри» (S. Liu *et al.*, 2002). В результате этого сигнала молекулы интегринов разворачиваются, и их сродство (аффинность) к ICAM-1 резко возрастает, после чего нейтрофилы полностью останавливаются (Lefort *et al.*, 2012).

Затем нейтрофилы проходят через эндотелий к очагу воспаления, этот процесс называется трансэндотелиальной миграцией. Она может осуществляться по двум механизмам: параклеточному и трансклеточному (Lerman & Kim, 2015). Большинство клеток предпочитают параклеточный путь: под действием воспалительных стимулов разрушаются соединения белков плотных контактов (кадгерин, окклюдин, ZO-1), а получившиеся промежутки служат «порталами» для мигрирующих нейтрофилов (Vestweber, 2007). Примечательно, что 75% лейкоцитов пересекают эндотелий в местах контакта трёх клеток («трёхклеточных уголках»), а не проходят через плотные соединения, которые находятся между двумя эндотелиальными клетками (Burns *et al.*, 1997). Направленность миграции обеспечивается перемещением белка PECAM-1, который переходит с поверхности эндотелиоцитов на сторону мембраны, взаимодействующей с другими эндотелиоцитами. Наибольшая концентрация PECAM-1 наблюдается в областях разрушения плотных контактов – то есть в тех местах, где нейтрофилы контактируют с мембраной эндотелиальных клеток (Mamdouh, Chen, Pierini, & Maxfield, 2003).

К трансклеточной миграции, по некоторым данным, способны не более 10% всех нейтрофилов (Carman & Springer, 2004). После плотной адгезии на поверхности сосудов нейтрофилы образуют особые структуры - подосомы (выросты мембраны), которыми они «прощупывают» эндотелиальную клетку, выискивая подходящие места для проникновения (не подойдёт, например, регион вокруг ядерной ламины, поскольку она довольно жёсткая) (Sinamon *et al.*, 2004; Carman *et al.*, 2007). После того, как подходящие участки нашлись, подосома нейтрофила внедряется в эндотелиальную клетку, которая окружает место инвазии множеством везикул, снижая поверхностное натяжение, что обеспечивает более глубокое проникновение лейкоцита (Millán *et al.*, 2006). Кроме того,

везикулы могут доставлять дополнительные адгезионные молекулы, которые повышают эффективность трансмиграции (Middleton, Patterson, Gardner, Schmutz, & Ashton, 2002). Основные молекулы, отвечающие за трансклеточную миграцию, – это ICAM-1, LFA-1 и Mac-1 (Carman & Springer, 2008).

2.2. Фагоцитоз

Нейтрофилы экспрессируют множество рецепторов, связывающих как патоген-ассоциированные молекулы, так и эндогенные сигналы опасности. Взаимодействие рецептора с лигандом вызывает в нейтрофилах как метаболические, так и морфологические изменения, способствующие хемотаксису, миграции и, в конечном итоге, фагоцитозу. Нейтрофилы приобретают вытянутую и ассиметричную форму; на обращённом к лиганду конце клетки образуются псевдоподии, необходимые для движения и фагоцитоза (Hirsch, 1962). Псевдоподии нейтрофилов содержат нитевидные сети, состоящие из актиновых филаментов и регуляторных белков. Актин в псевдоподии существует в аморфном состоянии и концентрируется на периферии клеток вместе с миозином, который участвует в фагоцитозе (Dale, Boxer, & Liles, 2008). Важно отметить, что нейтрофилы могут фагоцитировать как опсонизированные, так и не опсонизированные частицы (Lee, Harrison, & Grinstein, 2003).

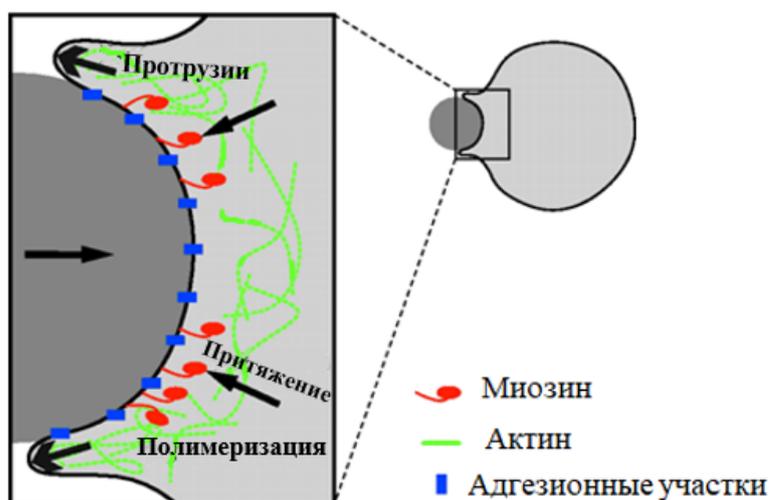


Рис. 3. Изменение цитоскелета в процессе фагоцитоза. Адаптировано из (Herant, 2006).

После того, как нейтрофил достиг своей цели (патогена), рецепторы на его мембране взаимодействуют с патогеном – в случае опсонизированных частиц это Fc γ -рецепторы. Это взаимодействие приводит к фосфорилированию и активации киназы Syk, а также

фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) (May & Machesky, 2001). В конечном итоге, происходит перестройка цитоскелета: на кромке клетки актин полимеризуется и «выталкивается» миозином, образуя окружающие частицу выступы мембраны; при этом натяжение в центре уменьшается и фагоцитируемая частица «проваливается» внутрь нейтрофила (Рис. 3) (Herant, 2006).

Образовавшаяся фагосома пока что не обладает противомикробной активностью и захваченный патоген может сбежать из неё невредимым – такое явление широко известно для золотистого стафилококка (Ko *et al.*, 2013). Для того, чтобы обезвредить фагоцитированные организмы, фагосома претерпевает процесс созревания – длинную череду преобразований, в ходе которых её содержимое становится крайне токсичным. Созревание включает в себя слияние с гранулами, в результате которого антимикробное содержимое гранул (лизозим, лактоферрин, катепсины В, D и G, миелопероксидаза и другие белки) попадает в фагосому, а также сборку НАДФН-оксидазы, продуцирующей активные формы кислорода (Lee *et al.*, 2003). Более подробно этот процесс описан в разделе 2.3 («Окислительный взрыв»).

2.3. Окислительный взрыв

Окислительный взрыв – это процесс образования нейтрофилами значительного количества активных форм кислорода. Они могут быть представлены как радикалами (супероксид-радикал, гидроксильный радикал), так и молекулами (пероксид водорода). Ключевым ферментом в этом процессе является НАДФН-оксидаза, катализирующая перенос электронов от НАДФН к молекуле кислорода с образованием супероксид-радикала. НАДФН-оксидаза содержит в себе каталитическое ядро флавоцитохром b558 (cytb₅₅₈), состоящее из двух трансмембранных белков gp91^{phox} и gp22^{phox}, и трёх регуляторных белков (p67^{phox}, p47^{phox} и p40^{phox}) (Chanock, Benna, Smith, & Babior, 1994).

В нейтрофилах НАДФН-оксидаза может иметь несколько состояний: неактивное, праймированное, активированное и гиперактивированное (Belambri *et al.*, 2018). В неактивном состоянии субъединицы фермента разъединены, чтобы предотвратить случайную генерацию токсичных для клетки АФК: каталитическое ядро находится в мембране специфических гранул или секреторных везикул, а регуляторные субъединицы остаются в цитоплазме (Manda-Handzlik & Demkow, 2015). В праймированном состоянии происходит фосфорилирование p47^{phox}, что приводит к его конформационным изменениям (El-Benna, Dang, & Gougerot-Pocidalò, 2008). Праймирование НАДФН-оксидазы может происходить в результате адгезии нейтрофилов, а также действия GM-CSF и

интерлейкина-8 (El-Benna *et al.*, 2016). Если затем нейтрофил сталкивается с активирующими агентами, то праймированное состояние НАДФН-оксидазы позволяет реализовать окислительный взрыв быстрее и большего масштаба, чем если бы праймирования не произошло.

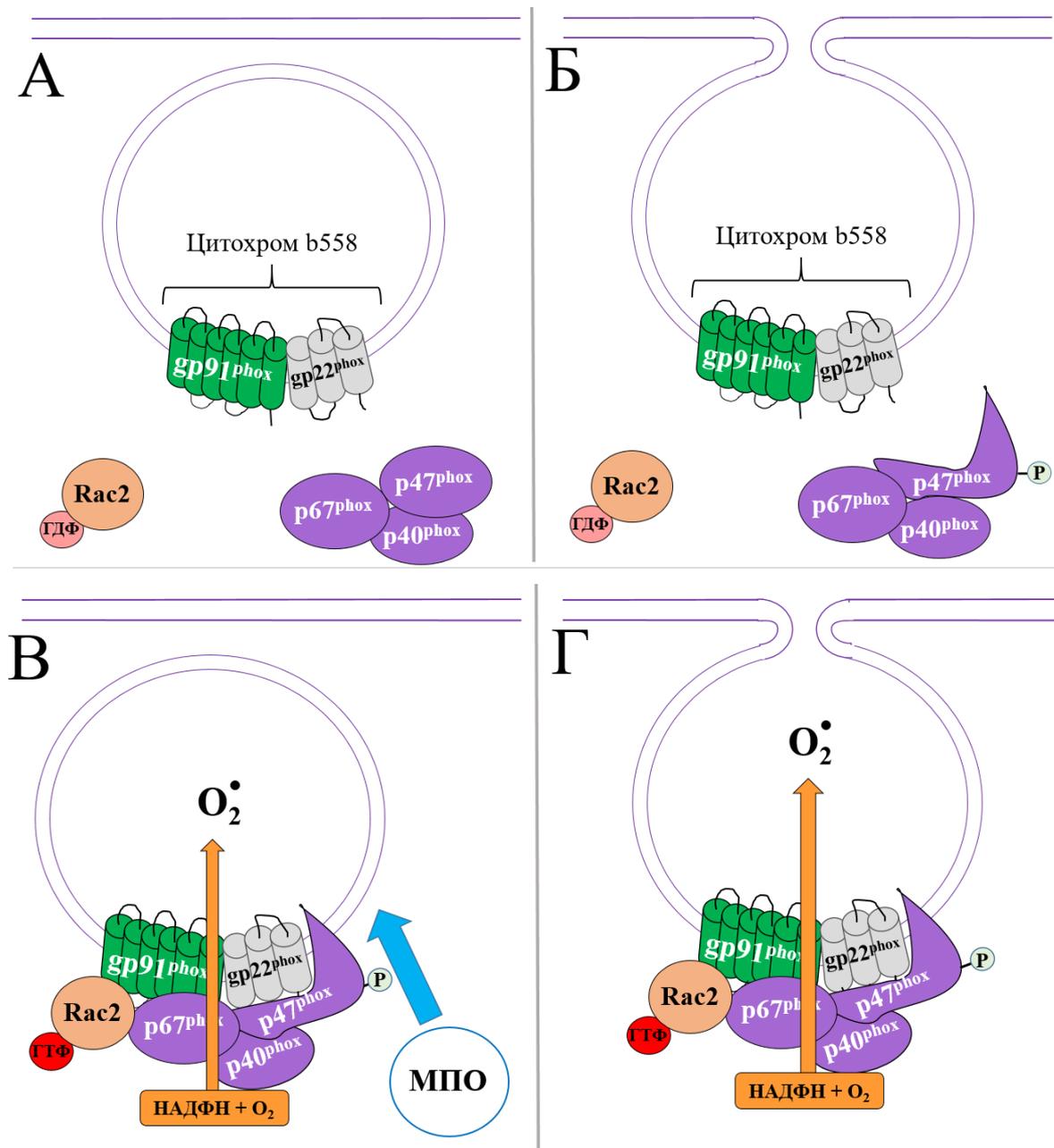


Рис. 4. Стадии активации НАДФН-оксидазы. Адаптировано из работы (Nguyen *et al.*, 2017). А – неактивное состояние; Б – праймированное состояние: субъединица p47^{phox} фосфорилируется и меняет конформацию; В – активное состояние, генерация АФК происходит в фагосоме, с фагосомой могут сливаться азурофильные гранулы, содержащие миелопероксидазу; Г – активное состояние, внеклеточная генерация АФК.

Наконец, активированное состояние НАДФН-оксидаза приобретает, когда ГТФаза Rac2 доставляет регуляторные факторы к каталитическому ядру в мембране гранул (Abo, Webb, Grogan, & Segal, 1994). Активацию НАДФН-оксидазы могут индуцировать опсонизированные бактерии, белок комплемента C5a, fMLP и форболовый эфир (PMA) (Belambri *et al.*, 2018).

Праймированное состояние НАДФН-оксидазы, за которым следует активация, может приводить к гиперактивации, что, с одной стороны, является весьма эффективным антимикробным оружием, но с другой – может приводить к неконтролируемому воспалению и повреждению окружающих тканей и органов. Для того, чтобы избежать такого развития событий, праймирование и активация НАДФН-оксидазы должны аккуратно регулироваться. Для этого существует многоступенчатый механизм активации, который включает обязательное исполнение каждого из трёх пунктов: фосфорилирование всех субъединиц НАДФН-оксидазы, активация Rac2 и транслокация регуляторных субъединиц из цитоплазмы, а также их правильная стыковка с каталитическим ядром (Belambri *et al.*, 2018).

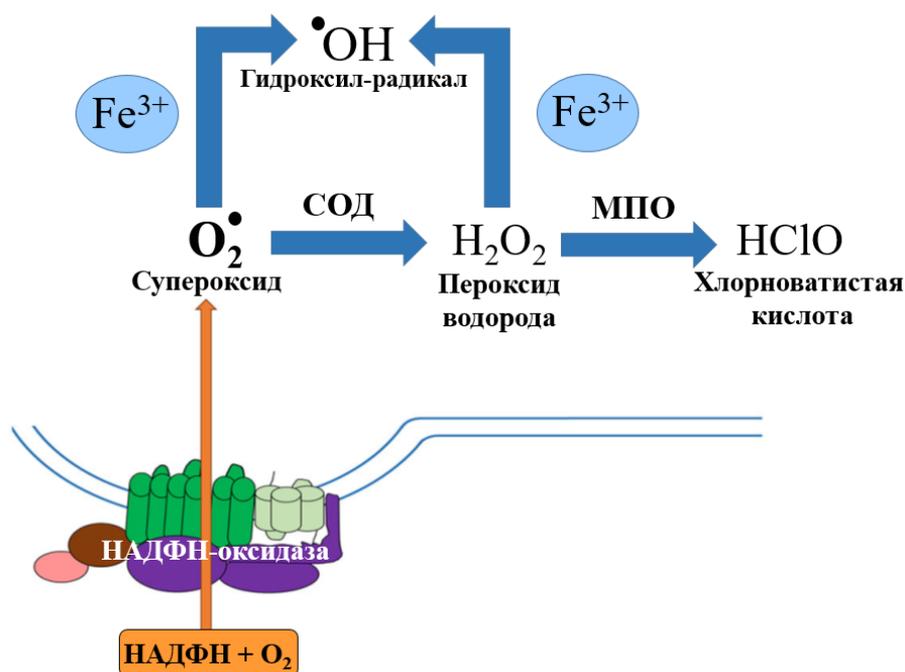


Рис. 5. Взаимосвязь активных форм кислорода в нейтрофилах. Адаптировано из работы (Nguyen *et al.*, 2017).

Производимый НАДФН-оксидазой супероксид-радикал необходим для уничтожения патогенов как в фагосоме, так и за пределами клетки (НАДФН-оксидаза в составе гранул может сливаться не только с фагосомой, но и с цитоплазматической мембраной, и тогда

активные формы кислорода попадают в межклеточное пространство). Также супероксид-радикал может использоваться для производства перекиси, которая, в свою очередь, нужна миелопероксидазе для синтеза хлорноватистой кислоты – тоже мощного антимикробного агента (Roos *et al.*, 2003).

Исключительную важность АФК и окислительного взрыва в нейтрофилах подтверждает редкий вид наследственного иммунодефицита – хронический гранулематоз, который развивается в связи с дефектом одной из субъединиц НАДФН-оксидазы (Patiño *et al.*, 1999). Фагоциты пациентов с таким диагнозом не могут производить достаточное количество АФК, поэтому не способны уничтожать некоторые патогены, что приводит к угрожающим жизни бактериальным и грибковым инфекциям (Marciano *et al.*, 2015).

2.4. Дегрануляция

Нейтрофилы содержат четыре разных типа гранул: (1) первичные гранулы, также известные как азурофильные гранулы; (2) вторичные (специфические) гранулы; (3) третичные гранулы; и (4) секреторные везикулы (Lacy, 2006). Первичные гранулы содержат наиболее токсичные вещества: эластазу, миелопероксидазу, катепсины и дефензины. Вторичные и третичные гранулы содержат лактоферрин и матриксную металлопротеазу 9 (также известную как желатиназа В) (Kjeldsen, Sengeløv, Lollike, Nielsen, & Vorregaard, 1994). Секреторные везикулы в нейтрофилах человека содержат сывороточный альбумин и рецепторы комплемента.

Гранулы не могут сливаться с плазматической мембраной и высвободить своё содержимое до тех пор, пока рецепторы образов опасности не свяжутся со своими лигандами и не активируют нейтрофилы. После узнавания патоген-ассоциированных или иных образов опасности рецепторы активируются и с помощью молекул-посредников запускают движение гранул к клеточной мембране или фагосоме (Lacy, 2006). После слияния с мембраной гранулы изливают своё содержимое наружу; весь этот процесс называется дегрануляцией. Дегрануляция находится под строгим контролем различных внутриклеточных каскадов, поскольку гранулы нейтрофилов богаты веществами, способными нанести тканям организма серьёзные повреждения.

Считается, что дегрануляция (экзоцитоз) происходит в 4 этапа (Toonen & Verhage, 2003). На первой стадии гранулы транспортируются из цитоплазмы к целевой мембране (клеточной или фагосомальной), для этого требуется перестройка цитоскелета и сборка микротрубочек. Затем происходит стыковка, в ходе которой наружный слой

фосфолипидного бислоя гранулы контактирует с внутренним слоем целевой мембраны. На третьей стадии между гранулой и фагосомой (или клеточной мембраной) образуется пора. Важно отметить, что образование данной структуры обратимо и через некоторое время пора может закрыться и дегрануляция не произойдёт (M. Lindau & Almers, 1995). Наконец, на четвёртой стадии происходит быстрое слияние за счёт расширения поры, при этом содержимое гранул попадает наружу (Burgoyne & Morgan, 2003).

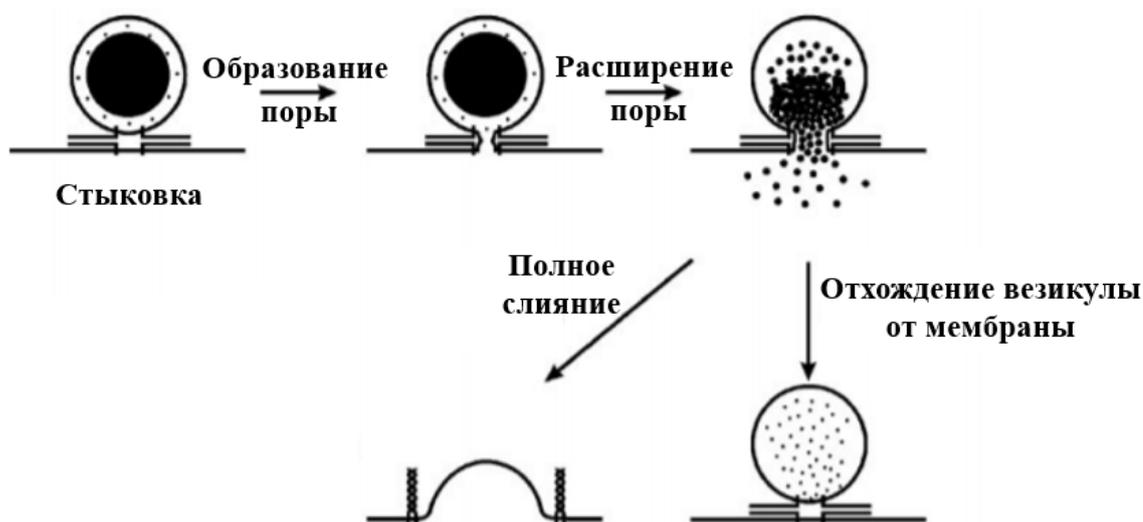


Рис. 6. Механизм слияния гранул с мембраной. Адаптировано из статьи (Burgoyne & Morgan, 2003).

Транслокация и экзоцитоз гранул требуют повышения концентрации внутриклеточного Ca^{2+} , а также гидролиза АТФ и ГТФ (Lacy, 2006). Несмотря на то, что кальций – это ключевой мессенджер, регулирующий дегрануляцию, молекулы-мишени этого процесса для него пока что неизвестны. Для АТФ и ГТФ известно больше, но также не всё: установлено, что после взаимодействия рецепторов, распознающих патогены или образы опасности, со своими лигандами происходит фосфорилирование различных сигнальных белков и их последующая активация (Sheshachalam, Srivastava, Mitchell, Lacy, & Eitzen, 2014). Основные участники передачи сигнала от рецепторов к гранулам – это киназы семейства Src и MAP-киназы (Mocsai *et al.*, 2000). Примечательно, что за транслокацию разных типов гранул отвечают разные белки: так, киназа Hck отвечает за слияние с мембраной первичных гранул, а Fgr и p38 – вторичных гранул (Gutkind & Robbins, 1989). Селективный набор киназ указывает на то, что в нейтрофилах существуют разные сигнальные пути, которые индуцируют экзоцитоз каждой популяции гранул по отдельности.

2.5. Образование внеклеточных ловушек (нетоз)

Внеклеточные ловушки нейтрофилов (Neutrophil extracellular traps, NETs) впервые были описаны в 2004 году с помощью новой технологии клеточной визуализации (Brinkmann *et al.*, 2004). Под действием форболового эфира (PMA) или интерлейкина-8 нейтрофилы выбрасывают из себя нити ДНК с гистонами и белковые агрегаты диаметром 15 и 25 нм соответственно. Белковые агрегаты ловушек состоят из содержимого азурофильных (эластаза, миелопероксидаза, катепсин G), вторичных (лактоферрин) и четвертичных (желатиназа) гранул, а белки цитоскелета (актин, тубулин) в них полностью отсутствуют. Интересно отметить, что источником ДНК для внеклеточных ловушек могут служить и митохондрии (Yousefi, Mihalache, Kozlowski, Schmid, & Simon, 2009).

Внеклеточные ловушки способны захватывать, удерживать и убивать как грам-положительные (*Staphylococcus aureus*), так и грамотрицательные бактерии (*Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*), а также грибы (*Candida albicans*) и простейших (Brinkmann *et al.*, 2004; Urban *et al.*, 2006; Guimaraes-Costa *et al.*, 2009; McCormick *et al.*, 2010). Патогены взаимодействуют с антимикробным содержимым гранул, концентрация которого в пределах ловушек крайне высока, и уничтожаются, а затем фагоцитируются.

Антимикробная активность опосредована различными компонентами внеклеточных ловушек. Бактерии уничтожаются посредством миелопероксидазы, продуцирующей ядовитый гипохлорит-анион и молекулярный хлор, лактоферрина и антимикробного пептида кателицидина, связывающего липополисахариды на поверхности бактерий (Papaianopoulos, Metzler, Nakkim, & Zychlinsky, 2010). Противогрибковая активность, вероятно, связана с кальпротектином, который связывает цинк, необходимый для метаболизма грибов (Urban *et al.*, 2009). Кроме того, гистоны и продукты их протеолиза также обладают антимикробной активностью и эффективно предотвращают распространение и размножение патогенов (Brinkmann *et al.*, 2004).

Образование внеклеточных ловушек (нетоз) требует активации НАДФН-оксидазы с помощью киназ MEK и ERK, образования активных форм кислорода и регуляции антиапоптотических белков (Nakkim *et al.*, 2011). Вопрос о необходимости АФК и НАДФН-оксидазы в нетозе остаётся нерешённым: ранее считалось, что без них нетоз невозможен, но недавние исследования показали, что к образованию внеклеточных

ловушек способны и нейтрофилы без НАДФН-оксидазы. Более подробно этот вопрос рассмотрен в разделе 4.1 (АФК и нетоз).

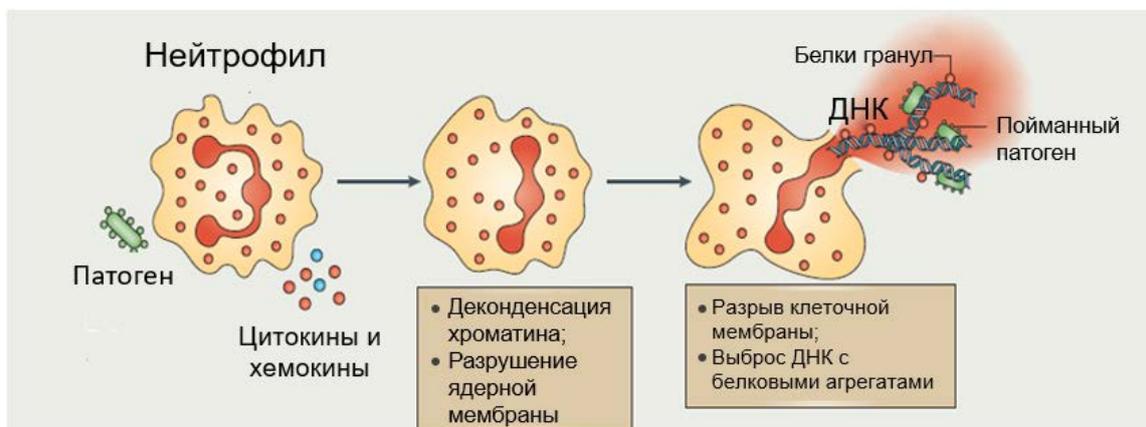


Рис. 7. Механизм нетоза. Адаптировано из работы (Mantovani, Cassatella, Costantini, & Jaillon, 2011).

В классической схеме, активация НАДФН-оксидазы приводит к образованию значительного количества АФК, которые опосредованно высвобождают из азурофильных гранул эластазу, причём этот процесс требует присутствия миелопероксидазы, хотя механизм её участия не совсем понятен (Papayannopoulos *et al.*, 2010). В цитоплазме эластаза разрушает F-актин, а затем транспортируется в ядро, где вместе с миелопероксидазой расщепляет гистоны H1 и H4, что приводит к деконденсации хроматина (Metzler, Goosmann, Lubojemska, Zychlinsky, & Papayannopoulos, 2014). Дефицит миелопероксидазы или эластазы приводит к полной неспособности нейтрофилов формировать внеклеточные ловушки (Metzler *et al.*, 2016). Однако прямой молекулярный механизм влияния АФК на эластазу и миелопероксидазу пока не описан. Также считается, что в деконденсации хроматина принимает участие фермент PAD4, дезаминирующий гистоны, что тоже вносит вклад в деконденсацию хроматина (Wang *et al.*, 2009).

Образование внеклеточных ловушек – это достаточно быстрый процесс: с момента активации до образования ловушек проходит, по некоторым данным, около 10 минут (Brinkmann *et al.*, 2004). По другим данным, формирование внеклеточных ловушек происходит не ранее, чем через 90 минут после контакта с индуктором нетоза (опсонизированным стафилококком) (van der Linden, Westerlaken, van der Vlist, van Montfrans, & Meuyaard, 2017). Первооткрывателями внеклеточных ловушек относительная быстрота процесса трактовалась как аргумент в пользу того, что нетоз – это новый вид клеточной смерти, поскольку протекает значительно быстрее, чем апоптоз, и имеет свои особенности: деконденсация хроматина, разрушение ядерной оболочки, смешение

содержимого ядра и цитоплазмы (Fuchs *et al.*, 2007). Однако впоследствии было показано, что образование внеклеточных ловушек иногда не мешает нейтрофилам жить дальше: так, под действием золотистого стафилококка нейтрофилы образуют внеклеточные ловушки *in vitro* и *in vivo*, но не умирают (Pilszczek *et al.*, 2010). Это оказалось возможным благодаря тому, что в формировании ловушки участвует только часть ядра, которая предварительно обособилась в виде везикулы. Таким образом, не нарушается целостность ядерной и плазматической мембран, в связи с чем нейтрофил остаётся жизнеспособным (Рис. 8). Более того, после потери хроматина и образования ловушек нейтрофилы могут быть подвижными и способными к фагоцитозу (Yip *et al.*, 2012; Peschel and Hartl, 2012).

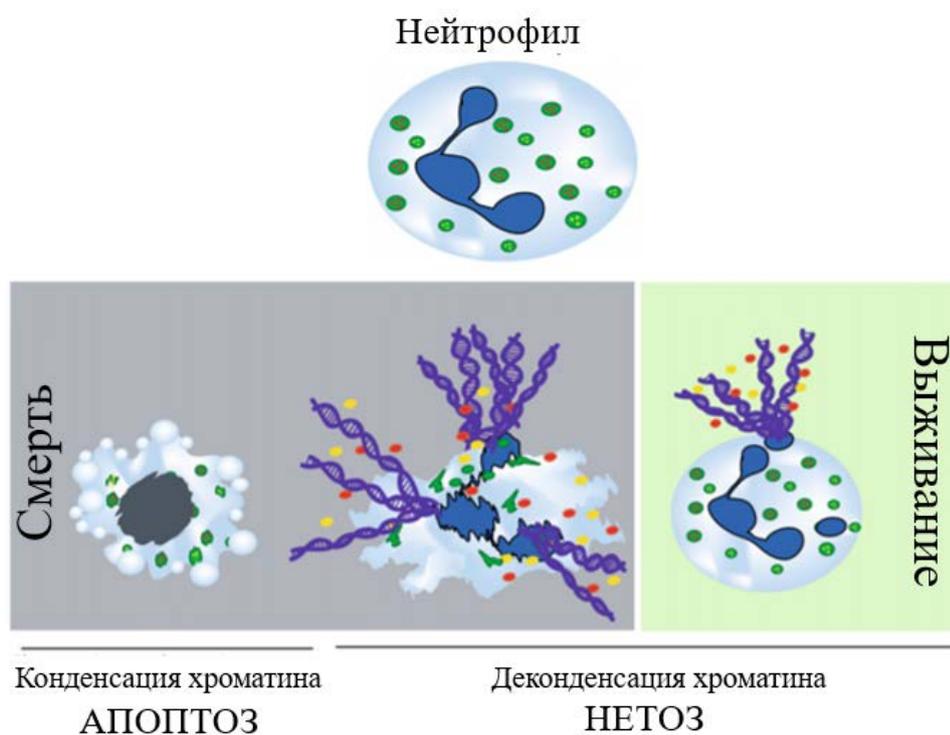


Рис. 8. Виды клеточной смерти нейтрофилов. Адаптировано из (Desai, Mulay, & Nakazawa, 2016).

3. Апоптоз нейтрофилов

Жизнь нейтрофилов крайне коротка по сравнению с жизнью остальных типов клеток нашего организма: максимальное время существования обычного нейтрофила – не более пяти дней (Pillay *et al.*, 2010). В течение этого времени нейтрофилы выходят из костного мозга, созревают и стареют. При нормальных физиологических условиях старение нейтрофилов сопровождается увеличением экспрессии на поверхности рецептора хемокинов CXCR4, что приводит к миграции нейтрофилов в костный мозг, печень и

другие органы, где они подвергаются апоптозу и фагоцитируются макрофагами (C. Martin *et al.*, 2003). Однако при действии воспалительных стимулов жизнь нейтрофилов обычно удлиняется в результате их активации для борьбы с патогенами, хотя иногда может и укорачиваться (некоторые виды нетоза приводят к быстрой гибели активированных нейтрофилов).

В целом, известно около 15 видов клеточной смерти эукариотических клеток (Savitskaya & Onishchenko, 2015), для нейтрофилов показано на данный момент показано не более шести (Iba, Hashiguchi, Nagaoka, Tabe, & Murai, 2013). Некоторые варианты клеточной смерти приводят к разрешению воспаления (апоптоз), а часть – наоборот, провоцирует его развитие (некроз, пироптоз). В данном разделе мы рассмотрим только противовоспалительные варианты клеточной гибели нейтрофилов.

Как уже упоминалось выше, нейтрофилы – это достаточно короткоживущие лейкоциты: после выхода из костного мозга среднее время жизни нейтрофилов составляет 4-5 дней (Pillay *et al.*, 2010). Апоптоз – крайне важный и сложно регулируемый этап в жизненном цикле нейтрофилов, поскольку слишком быстрая и массовая смерть нейтрофилов приведёт к нейтропении и подверженности организма инфекциям, а излишне долгая жизнедеятельность – наоборот, может вызвать хроническое воспаление (Wesche, 2005; Bartels *et al.*, 2016).

3.1. Спонтанный апоптоз (внутренний путь)

В отсутствие провоспалительных сигналов нейтрофилы подвергаются спонтанному апоптозу, который запускается внутренними процессами. Кроме того, апоптоз может быть вызван внешними факторами, например, связыванием определённых молекул с рецепторами клетки (TNF, Fas-лиганд) или избытком АФК в окружении нейтрофила (Kasahara *et al.*, 1997; Salamone *et al.*, 2001; Perskvist *et al.*, 2002). И индуцируемый, и спонтанный апоптоз включают в себя следующие события: активация каспаз, фрагментация ДНК и конденсация хроматина, распад микротрубочек, потеря асимметрии мембраны и образование апоптотических телец. Апоптотические тельца нейтрофилов затем поглощаются макрофагами или дендритными клетками; этот процесс сопровождается синтезом и секрецией противовоспалительных цитокинов (Duffin, Leitch, Fox, Haslett, & Rossi, 2010). Таким образом, апоптоз – это наиболее предпочтительный (с точки зрения разрешения воспаления) вариант гибели нейтрофилов по сравнению с некрозом или пироптозом, поскольку именно этот вид клеточной смерти приводит к разрешению воспаления.

Ключевую роль в развитии спонтанного апоптоза играют митохондрии и баланс между анти- и проапоптотическими белками. К основным антиапоптотическим белкам относят Mcl-1, A1 и Bcl-X_l, гомологи белка Bcl-2, который в нейтрофилах не присутствует. Время полужизни Mcl-1 составляет не более 4 часов, поэтому в отсутствие провоспалительных стимулов снижение экспрессии этого белка обеспечивает нейтрофилам короткий жизненный цикл (Leuenroth, Grutkoski, Ayala, & Simms, 2000). У проапоптотических белков (Bax, Bid, Bim) время полужизни составляет 12 ч и более (Weinmann, Gaegtgens and Walzog, 1999; Andina *et al.*, 2009). При действии на нейтрофилы антиапоптотических факторов (ЛПС, GM-CSF, провоспалительные цитокины и др.) экспрессия Mcl-1 увеличивается, а Bax и Bad фосфорилируются и инактивируются, что приводит к увеличению продолжительности жизни нейтрофилов (Dibbert *et al.*, 1999; Derouet *et al.*, 2004). Это происходит благодаря способности Mcl-1 образовывать гетеродимеры с проапоптотическими белками Bax и Bak, что мешает им создавать поры в митохондриях (Thomas, Lam, & Edwards, 2010). При отсутствии внешних стимулов экспрессия антиапоптотических белков падает, в то время как количество проапоптотических белков практически не изменяется. В результате этого проапоптотические белки соединяются в димеры и внедряются во внешнюю мембрану митохондрий, образуя пору. Образование поры зависит от ионов кальция и требует взаимодействия проапоптотических белков с кардиолипином, липидом внутренней митохондриальной мембраны (Brookes, 2004). Антиапоптотический белок Bcl-X_l взаимодействует с эндоплазматическим ретикуломом, основным хранилищем Ca²⁺, что приводит к медленному выделению ионов кальция в цитоплазму. В свою очередь, Bax, Bad и tBid (truncated Bid, активная форма белка) тоже могут связываться с эндоплазматическим ретикуломом, вызывая резкий выброс большого количества ионов кальция в цитоплазму, что вносит вклад в развитие апоптоза (Zong *et al.*, 2003).

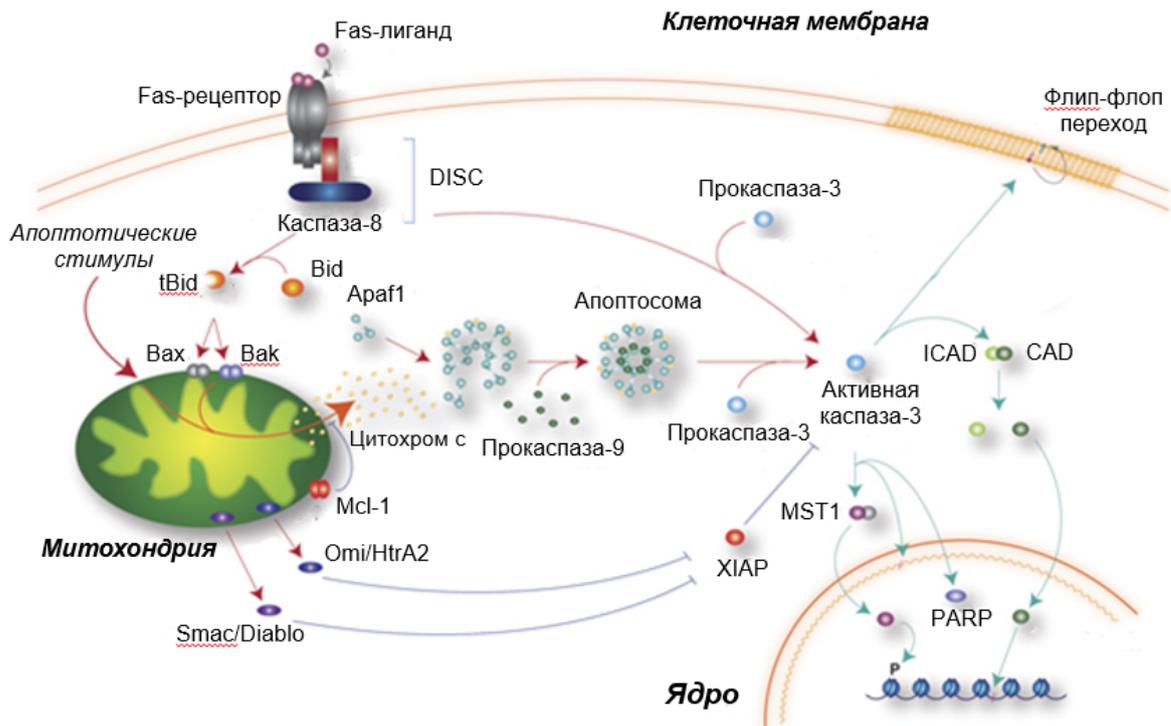


Рис. 9. Основные сигнальные пути апоптоза нейтрофилов. Адаптировано из (D'Amelio, Cavallucci, & Сесconi, 2010).

Образование митохондриальной поры приводит к утечке цитохрома с, а также белков SMAC (second mitochondria-derived activator of caspases) и HtrA2 (High temperature-requirement protein A2) в цитоплазму.

В цитоплазме в присутствии АТФ цитохром с взаимодействует с белком Араф-1, запуская его олигомеризацию. Образовавшийся гептамерный комплекс имеет массу более миллиона дальтон и называется апоптосомой. Апоптосома связывает прокаспазу-9 и с помощью частичного протеолиза превращает её в активную каспазу-9, которая расщепляет прокаспазу-3 до активной каспазы-3. Каспаза-3 узнаёт мотив из четырёх аминокислот (DXXD) и расщепляет множество ключевых в метаболизме клетки белков, среди них:

- ICAD (Inhibitor of Caspase Activated DNase), и это расщепление приводит к активации эндонуклеазы CAD (Caspase Activated DNase) и деградации ДНК;
- PARP (Poly ADP ribose polymerase), и это расщепление блокирует возможность репарации ДНК;
- ROCK (Rho-associated protein kinase), и это расщепление приводит к разрушению цитоскелета;

- Факторы транскрипции и трансляции, расщепление которых приводит к остановке клеточного метаболизма.

Интересно отметить, что в нейтрофилах мало митохондрий и, соответственно, крайне мало цитохрома *c*, поэтому выдвигались гипотезы, что апоптосома может собираться без участия цитохрома *c*. Однако оказалось, что цитохром *c* всё-таки необходим для активации каспазы-9, но даже его небольшого количества достаточно, поскольку в нейтрофилах увеличенное по сравнению с другими клетками количество Araf-1, а также выше его сродство к цитохрому (В. М. Murphy, O'Neill, Adrain, Watson, & Martin, 2003).

3.2. Индуцируемый апоптоз нейтрофилов (внешний путь)

Как уже упоминалось выше, нейтрофилы после созревания довольно быстро подвергаются апоптозу без влияния внешних стимулов. Внеклеточные факторы могут как продлевать жизнь нейтрофилов (различные провоспалительные агенты, например, ЛПС), так и вызывать апоптоз. К молекулам, способным индуцировать апоптоз нейтрофилов, относят FasL, TNF и TRAIL. Рецепторы к этим факторам экспрессируются на поверхности нейтрофилов и называются рецепторами смерти из-за их способности запускать апоптоз после взаимодействия со своим лигандом. Каждый рецептор смерти содержит богатый цистеином внеклеточный домен, распознающий свой лиганд, и внутриклеточный домен (домен смерти, death domain), отвечающий за связывание белков, запускающих апоптоз (Akgul & Edwards, 2003).

3.2.1. Fas-опосредованный апоптоз

Fas-рецептор (First apoptosis signal receptor, FasR), известный также как CD95, конститутивно экспрессируется на поверхности нейтрофилов. Его лиганд, FasL, представляет собой гомотример и экспрессируется в основном на цитотоксических Т-лимфоцитах, данные о его наличии у нейтрофилов противоречивы (Liles *et al.*, 1996; Brown and Savill, 1999; Serrao *et al.*, 2001).

После связывания Fas-лиганда с Fas-рецептором происходит тримеризация последнего и кластеризация его внутриклеточных доменов смерти. Это привлекает адаптерные белки, самым важным из них является FADD (Fas-associated death domain-containing protein), связывающийся с активированным рецептором с помощью своих собственных доменов смерти (Nagata, 1997). Также FADD содержит эффекторный домен смерти (death effector domain), которым он связывается с неактивной прокаспазой-8. Белковый комплекс,

состоящий из Fas-рецептора, FADD и прокаспазы-8, называется DISC (death inducing signaling complex) (Medema *et al.*, 1997). В этом комплексе про-каспазы-8 превращается в активную каспазу-8 в результате автокаталитического протеолиза (Muzio, Stockwell, Stennicke, Salvesen, & Dixit, 1998). Активная каспаза-8, в свою очередь, расщепляет прокаспазы-3, -6 и -7, и это запускает те же процессы, что были рассмотрены в разделе 3.1.1 (спонтанный апоптоз).

Нейтрофилы относятся к так называемым клеткам II типа, которым для развития апоптоза требуется дополнительная амплификация сигнала за счёт вовлечения митохондрий. Активная каспаза-8 подвергает частичному протеолизу белок Bid, превращая его в активную форму tBid, которая способна образовывать димеры с апоптотическими белками Bax и Bak и создавать пору во внешней митохондриальной мембране (Baumann *et al.*, 2003). После образования поры все дальнейшие события происходят так же, как и в случае спонтанного апоптоза.

3.2.2 TNF-опосредованный апоптоз

В отличие от Fas-зависимого апоптоза, который происходит практически одинаково в нейтрофилах и других типах клеток, TNF-зависимый апоптоз в нейтрофилах разительно отличается.

Нейтрофилы экспрессируют на своей поверхности два типа рецепторов к TNF: TNFR1 и TNFR2, причём у TNFR2 выше сродство к лиганду (McCaffrey, Newsome, Fibach, Yoshida, & Su, 2015). Связывание с TNF приводит к тримеризации рецепторов, после чего с ними взаимодействуют адаптерные белки TRADD (TNFR-associated death domain-containing proteins) с помощью своих доменов смерти (Ashkenazi & Dixit, 1998). Эти молекулы могут также взаимодействовать с другими адаптерными белками – RIP и TRAF-2, которые запускают множество каскадов, в том числе: NF-κB путь, PI3K-путь, MAP-киназный каскад, AP-1-зависимую экспрессию и другие (Zu *et al.*, 1998; Moulding *et al.*, 2001; Geering *et al.*, 2011). Влияние на столь большое количество различных сигнальных путей в клетке объясняет специфический для нейтрофилов эффект: TNF может действовать как анти-, так и проапоптотический фактор. В небольших концентрациях (0,1 – 1 нг/мл) TNF увеличивает выживаемость нейтрофилов, в больших концентрациях (10 – 100 нг/мл) – индуцирует апоптоз (van den Berg, Weyer, Weening, Roos, & Kuijpers, 2001). Более того, на коротких временах (2-8 часов после выделения) TNF повышает уровень апоптоза у субпопуляции нейтрофилов, а на более длинных (20 часов) – наоборот, увеличивает выживаемость (McCaffrey *et al.*, 2015).

Считается, что за антиапоптотический эффект TNF отвечают MAP-киназа p38, PI3K/Akt-путь и NF-κB-зависимые пути, активация которых приводит, в частности, к фосфорилированию проапоптотического белка Bad и его инактивации, а также к синтезу антиапоптотического интерлейкина-8 (Dunican *et al.*, 2000; Cowburn *et al.*, 2002). За проапоптотический эффект, по-видимому, ответственна протеинкиназа C, изотип ζ (Das, Bhattacharyya, Ghosh, & Majumdar, 1999). Однако полный спектр белков, TNF-зависимый синтез которых отвечает за апоптоз или выживание нейтрофилов, ещё предстоит выяснить.

Ещё одной важной особенностью TNF-опосредованного апоптоза является его возможная независимость от каспазы-8. Адаптерный белок TRADD может взаимодействовать с FADD, который отвечает за активацию про-каспазы-8 в Fas-зависимом пути клеточной смерти. Тем не менее, имеются данные, указывающие на то, что активация каспазы-8 не является обязательной для апоптоза под действием TNF (Maianski, Roos, & Kuijpers, 2003). Более того, в нейтрофилах под действием TNF не наблюдается расщепление проапоптотического белка Bid, осуществляемое каспазой-8 (Geering *et al.*, 2011). Также не наблюдается падение митохондриального потенциала и выход цитохрома c в цитоплазму, а блокирование каспазы-9 специфическим ингибитором не приводит к уменьшению апоптоза после инкубации с TNF (Yuo *et al.*, 1989; Salamone *et al.*, 2001; Geering *et al.*, 2011).

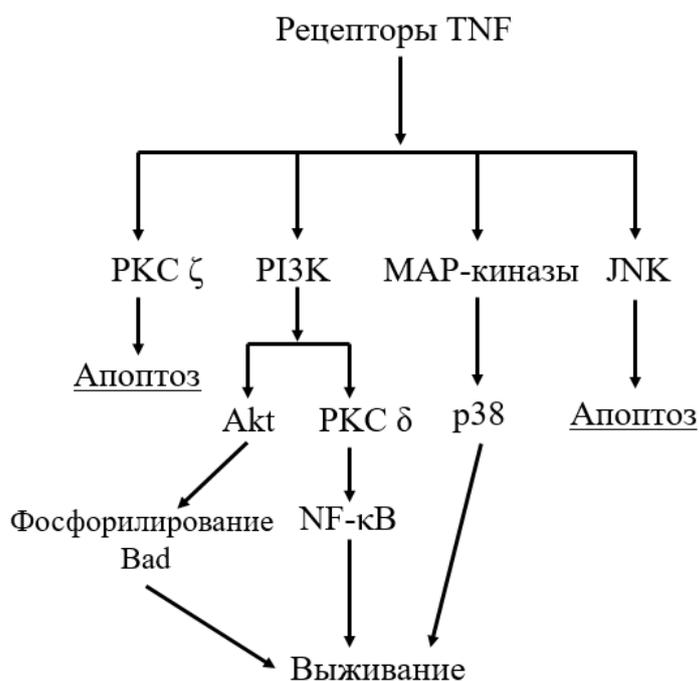


Рис. 10. Сигнальные каскады в TNF-индуцируемом апоптозе. Адаптировано из (Akgul & Edwards, 2003).

С другой стороны, имеются данные, что под действием TNF меняется форма митохондрий и происходит перемещение белка Вах в мембраны митохондрий, но эти процессы могут быть связаны с АФК и другими молекулами, а не с каспазой-8 (Maiani *et al.*, 2003). Несмотря на неоднозначную роль каспазы-8 и митохондрий в передаче сигнала от кластеризованного рецептора, участие каспазы-3 в развитии TNF-зависимого апоптоза не вызывает сомнений, хотя механизмы её активации и регуляции недостаточно изучены.

3.2.3. TRAIL-индуцируемый апоптоз

Наименее изученным видом клеточной смерти нейтрофилов является TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand)-индуцируемый апоптоз. Нейтрофилы человека экспрессируют TRAIL и 4 вида рецепторов к нему (TRAIL-R1, -R2, -R3, -R4), причём только первый и второй тип рецепторов имеют домены смерти и могут вызвать апоптоз, третий же и четвёртый тип доменов смерти не имеют и могут действовать как рецепторы-«обманки», защищая клетки от апоптоза.

Про влияние TRAIL на жизнедеятельность нейтрофилов известно немного: взаимодействие нейтрофилов с этим фактором не увеличивает хемотаксис, но повышает уровень апоптоза, а пути передачи сигнала не включают в себя NF-κB-зависимый путь. Выдвигались предположения, что TRAIL нужен для ограничения влияния провоспалительных цитокинов на выживаемость нейтрофилов, чтобы даже в условиях воспаления нейтрофилы могли подвергаться апоптозу, не вызывая избыточный иммунный ответ.

3.3. Регуляция апоптоза

Апоптоз для клетки – это билет в один конец, поэтому данный процесс имеет сложную регуляторную сеть. В основном, вся регуляция осуществляется выше уровня каспазы-3, потому что после её активации повернуть процесс вспять невозможно.

Протеолитическая активность каспаз регулируется семейством белков IAP (inhibitors of apoptosis), из которого в нейтрофилах экспрессируются 4 представителя: cIAP1, cIAP2, XIAP (X-linked IAP) и сурвивин. В основном, эти белки ингибируют каспазу-9 и

каспазу-3, образуя комплексы с ними. Антиапоптотические факторы, такие как G-CSF, увеличивают экспрессию белков этого семейства (Solaroglu, Tsubokawa, Cahill, & Zhang, 2006). В свою очередь, активность белков семейства IAP ингибируется проапоптотическими молекулами, высвобождаемыми митохондриями: так, Smac и HtrA2, которые попадают в цитоплазму вместе с цитохромом *c* после образования поры, взаимодействуют с комплексом XIAP-каспаза-9, дестабилизируя его, что приводит к высвобождению каспазы-9 и развитию апоптоза (Verhagen *et al.*, 2000).

Сурвивин, самый маленький (по молекулярной массе) белок из семейства IAP. Его экспрессия высока в незрелых нейтрофилах, но с их возрастом резко снижается (Altznauer, Martinelli, *et al.*, 2004). Так же, как и в случае других белков IAP, количество сурвивина увеличивается в ответ на антиапоптотические и провоспалительные факторы, не давая нейтрофилам подвергнуться апоптозу. Однако в отличие от своих собратьев, сурвивин не взаимодействует напрямую с каспазами, а связывается с белком XIAP, увеличивая его стабильность и сродство к каспазам (Altieri, 2010).

Ещё одним важным регулятором апоптоза является кальпаин из семейства некаспазных цистеиновых протеаз нейтрофилов. В молодых нейтрофилах кальпаин связан с кальпастатином, своим высокоспецифичным ингибитором, но в процессе спонтанного апоптоза уровень кальпастина падает, что приводит к активации кальпаина (Squier *et al.*, 1999). Активированный кальпаин расщепляет проапоптотический фактор Вах до его активного фрагмента, который не связывается антиапоптотическим белком Bcl-X₁ и поэтому не ингибируется им (Altznauer, Conus, Cavalli, Folkers, & Simon, 2004). Также кальпаин может подвергаться протеолизу и таким образом выводить из строя белок XIAP, упоминавшийся выше (Kobayashi *et al.*, 2002). Важно отметить, что ингибирования кальпаина недостаточно для того, чтобы предотвратить апоптоз, поскольку нарушение баланса между про- и антиапоптотическими факторами может происходить и без его участия.

Транскрипционные факторы FOXO также участвуют в регуляции экспрессии и активности белков из семейства Bcl-2. У нейтрофилов, стимулированных fMLP, увеличиваются экспрессия Mcl-1 и сопутствующее фосфорилирование FOXO1, FOXO3a и FOXO4 посредством активации PI-3K и MAP-киназ (Crossley, 2003). Более того, было показано, что фосфорилированный FOXO1 может образовывать комплекс с Mcl-1, регулируя таким образом его активность (Birkenkamp & Coffey, 2003). Также в мышинной модели ревматоидного артрита FOXO3a ингибировал экспрессию Fas-лиганда (FasL) в

нейтрофилах после стимуляции их TNF и, таким образом, предотвращал апоптоз (Jonsson, Allen, & Peng, 2005).

Недавно у нейтрофилов были открыты ещё одни важные регуляторы апоптоза – ферменты клеточного цикла. Долгое время считалось, что поскольку нейтрофилы – это зрелые неделяющиеся клетки, остановившиеся в G0-фазе, то белки, отвечающие за продвижение по клеточному циклу, у них отсутствуют или нефункциональны. Тем не менее, оказалось, что нейтрофилы экспрессируют циклин-зависимые киназы CDK1, CDK2 и CDK5. Более того, различные ингибиторы этих ферментов запускают каспаз-зависимый апоптоз и даже способны отменять действие таких сильных антиапоптотических сигналов, как GM-CSF и ЛПС (Rossi *et al.*, 2006). Имеются данные, что механизм действия циклин-зависимых киназ связан с поддержанием экспрессии антиапоптотического белка Mcl-1, а ингибиторы CDK понижают его уровень и индуцируют апоптоз (Leitch *et al.*, 2010). Ещё один белок клеточного цикла, участвующий в апоптозе нейтрофилов, – это ядерный антиген пролиферирующих клеток (proliferating cell nuclear antigen, PCNA). В большинстве клеток этот фактор обнаруживается в ядре, поскольку участвует в репликации, но у нейтрофилов наблюдается высокая концентрация PCNA в цитоплазме, где он, по всей видимости, связывается с про-каспазами, препятствуя их активации (Witko-Sarsat *et al.*, 2010). Снижение экспрессии белка PCNA приводит к увеличению уровня апоптоза нейтрофилов, тогда как стимуляция нейтрофилов антиапоптотическим фактором G-CSF вызывает увеличение экспрессии белка PCNA (Witko-Sarsat *et al.*, 2010).

4. Роль активных форм кислорода в физиологии нейтрофилов

Активные формы кислорода представляют собой гетерогенную группу кислородсодержащих молекул с высокой реакционной способностью, некоторые из них оказываются неустойчивыми и чрезвычайно активными из-за неспаренного электрона. Эта группа включает в себя пероксиды (R-O-O-R), гидроксил-радикал ($\cdot\text{OH}$), синглетный кислород, супероксид-радикал (O_2^-) и некоторые другие соединения. При физиологических условиях АФК образуются либо как побочные продукты окислительно-восстановительных реакций в различных клеточных органеллах (митохондрии, пероксисомы и эндоплазматический ретикулум), либо как необходимые реагенты для ферментативной деятельности оксидаз и оксигеназ. Некоторые АФК (пероксид водорода) уже давно известны как вторичные мессенджеры для многих типов клеток, роль других (синглетного кислорода, например) остаётся спорной ввиду их низкой стабильности и специфичности (Белоусов, Ениколопов и Мишина, 2012).

Несмотря на то, что небольшое количество АФК в клетках необходимо для их нормального функционирования, избыточная их генерация – происходящая, в основном, в результате нарушения функционирования митохондрий – приводит к окислительному стрессу и клеточной смерти. Нейтрофилы принципиально отличаются, во-первых, тем, что для них повышенный уровень АФК скорее норма, поскольку это один из основных механизмов антимикробной защиты; во-вторых, главным источником АФК в нейтрофилах служат не митохондрии (их мало и их активность низкая), а НАДФН-оксидаза. Однако роль АФК как внутриклеточных посредников в передаче сигнала у нейтрофилов изучена довольно мало.

Ещё менее изученным остаётся вопрос о митохондриальных АФК и их значении в метаболизме нейтрофилов. Достоверно известно, что митохондрии нейтрофилов способны продуцировать АФК. Несмотря на то, что окислительное фосфорилирование в нейтрофилах практически не протекает, потенциал на митохондриальной мембране присутствует. В процессе созревания нейтрофилов уровень цитохрома *c*, передающего электроны с комплекса III на комплекс IV, понижается, что может приводить к увеличению продукции АФК (Maiani *et al.*, 2004). Действительно, было показано, что добавление азида, ингибитора дыхательной цепи, уменьшало количество внутриклеточных АФК, чего не наблюдалось при добавлении DPI, ингибитора НАДФН-оксидазы (Narayanan, Ragheb, Lawler, & Robinson, 1997). Однако до сих пор влияние митохондриальных АФК на активацию и апоптоз нейтрофилов исследовано недостаточно подробно.

4.1 Активные формы кислорода и нетоз

Многочисленные исследования показывают, что активные формы кислорода, продуцируемые НАДФН-оксидазой внутри нейтрофилов, способны стимулировать образование внеклеточных ловушек у нейтрофилов (Neutrophil extracellular traps, NETs) (Wartha & Henriques-Normark, 2008). Ингибиторы НАДФН-оксидазы (DPI, например) уменьшают количество АФК и предотвращают образование внеклеточных ловушек под действием форболового эфира (PMA) (Fuchs *et al.*, 2007; Keshari *et al.*, 2013). Нейтрофилы без функциональной НАДФН-оксидазы, например, у пациентов с хроническим гранулематозом, не могут образовывать внеклеточные ловушки (Bianchi *et al.*, 2009), но инкубация *in vitro* таких нейтрофилов с синглетным кислородом приводила к нетозу (Nishinaka, Arai, Adachi, Takaori-Kondo, & Yamashita, 2011). Несмотря на то, что все данные однозначно свидетельствуют о важной роли АФК в развитии нетоза, до сих пор

неясно, каким же образом АФК запускают этот процесс: в частности, неизвестно, на какую именно стадию (деконденсация хроматина, связывание ферментов с ДНК, разрыв мембраны) и как они влияют. Имеются данные о том, что АФК могут способствовать высвобождению эластазы и миелопероксидазы из азурофильных гранул, что создаёт предпосылки к их переходу в ядро и деконденсации хроматина (Papaannopoulos *et al.*, 2010; Branzk and Papaannopoulos, 2013).

Важно отметить, что АФК, генерируемые НАДФН-оксидазой, необходимы для развития нетоза, но только их недостаточно, поскольку та же самая перекись, генерируемая этим ферментом, способна привести клетку как в нетоз, так и в апоптоз. Поэтому для формирования внеклеточных ловушек нужны дополнительные факторы, как зависящие, так и не зависящие от НАДФН-оксидазы, в том числе: активация протеинкиназы С и Р13К-пути, увеличение внутриклеточной концентрации цинка, присутствие катепсина С и другие.

Более того, некоторыми исследователями ставится под сомнение необходимость АФК, создаваемых НАДФН-оксидазой, для образования внеклеточных ловушек у нейтрофилов под действием определённых стимулов. Так, было показано, что существует НАДФН-независимый путь нетоза, запускаемый ионофорами кальция (иономицином). Несмотря на то, что иономицин запускал окислительный взрыв, то есть образование АФК НАДФН-оксидазой, ингибирование НАДФН-оксидазы никак не влияло на нетоз под действием этого ионофора (Parker, Dragunow, Hampton, Kettle, & Winterbourn, 2012). Впоследствии было показано, что для подобного Ca^{2+} -зависимого нетоза требуется образование митохондриальных АФК. В случае же нетоза под действием РМА, полностью зависящего от АФК НАДФН-оксидазы, увеличение митохондриальных АФК не наблюдается. Также НАДФН-независимый нетоз у нейтрофилов наблюдали под действием мочевой кислоты, но механизмы этого процесса пока не изучены (Arai *et al.*, 2014).

4.2. Активные формы кислорода и апоптоз

Данные о вкладе АФК, особенно митохондриальных, в активацию и апоптоз нейтрофилов немногочисленны и иногда противоречивы. Однако достоверно известно, что АФК влияют на некоторые внутриклеточные каскады, а также на внутренний и внешний пути апоптоза.

Низкое количество АФК приводит к отложенному спонтанному апоптозу у нейтрофилов. Так, нейтрофилы в условиях гипоксии живут значительно дольше, чем в обычных

условиях. Их повышенная живучесть определяется увеличением количества транскрипционных факторов HIF-1 (hypoxia-induced factor 1) и NF-κB p65 (Walmsley *et al.*, 2005). Важно отметить, что активация HIF-1 приводит к экспрессии множества белков, в том числе и Mcl-1 – главного антиапоптотического фактора нейтрофилов (Piret *et al.*, 2005). Также известно, что нейтрофилы пациентов с хроническим гранулематозом имеют повышенную продолжительность жизни, поскольку дефектная НАДФН-оксидаза практически не производит АФК (Kasahara *et al.*, 1997). Также известно, что добавление ферментов-антиоксидантов супероксиддисмутазы и каталазы к суспензии нейтрофилов может откладывать их апоптоз, но эти данные спорны (Oishi & Machida, 1997). Во-первых, сами же авторы утверждают, что денатурированная марганцевая супероксиддисмутаза оказывала такой же антиапоптотический эффект, что, скорее всего, связано со свойствами соединений самого марганца. Во-вторых, по данным других исследователей, апоптоз способна ингибировать каталаза, но не супероксиддисмутаза, что может указывать на приоритетную роль в развитии апоптоза пероксида водорода, но не супероксид-радикала (Rollet-Labelle *et al.*, 1998).

Однако имеются интересные данные о том, что в условиях гипоксии снижается общее количество АФК, но растёт количество мтАФК, что может приводить к увеличению продолжительности жизни нейтрофилов (Chandel *et al.*, 2000). Антимитин, ингибитор дыхательной цепи митохондрий, увеличивал продукцию мтАФК и откладывал апоптоз, но этот эффект снимался митохондриально-направленным антиоксидантом MitoQ (Van Raam, 2009). Всё это указывает на то, что увеличение количества мтАФК, в отличие от общих АФК, снижает уровень апоптоза нейтрофилов.

Высокие концентрации АФК, напротив, приводят к увеличению уровня апоптоза в нейтрофилах. Так, известно, что окислительный взрыв, последовавший за фагоцитозом, увеличивает количество апоптотических нейтрофилов (R. W. Watson, Redmond, Wang, Condron, & Bouchier-Hayes, 1996). Различные антиоксиданты, нейтрализующие пероксид водорода (N-ацетилцистеин, глутатион), добавленные к фагоцитировавшим нейтрофилам, снимали проапоптотический эффект производимых в ходе окислительного взрыва АФК, но не оказывали никакого эффекта на спонтанный апоптоз (R. W. Watson *et al.*, 1996). По другим данным, глутатион, но не N-ацетилцистеин, откладывал спонтанный апоптоз с помощью фосфорилирования киназы Akt, деактивирующейся под действием АФК во время апоптоза (Xu *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2006). Интересно отметить, что ДМСО, нейтрализующий гидроксид-радикал, не оказывал никакого влияния на фагоцитоз-индуцируемый апоптоз (Yamamoto, Taniuchi, Tsuji, Nasui, & Kobayashi, 2002). Исходя из

этого, можно заключить, что в апоптозе нейтрофилов важную роль играет перекись, но не гидроксид-радикал. Это заключение подтверждается тем фактом, что глутатион и N-ацетилцистеин уменьшают активность каспазы-3 и каспазы-8 в ходе Fas-индуцируемого апоптоза (G. W. R. Watson *et al.*, 1999).

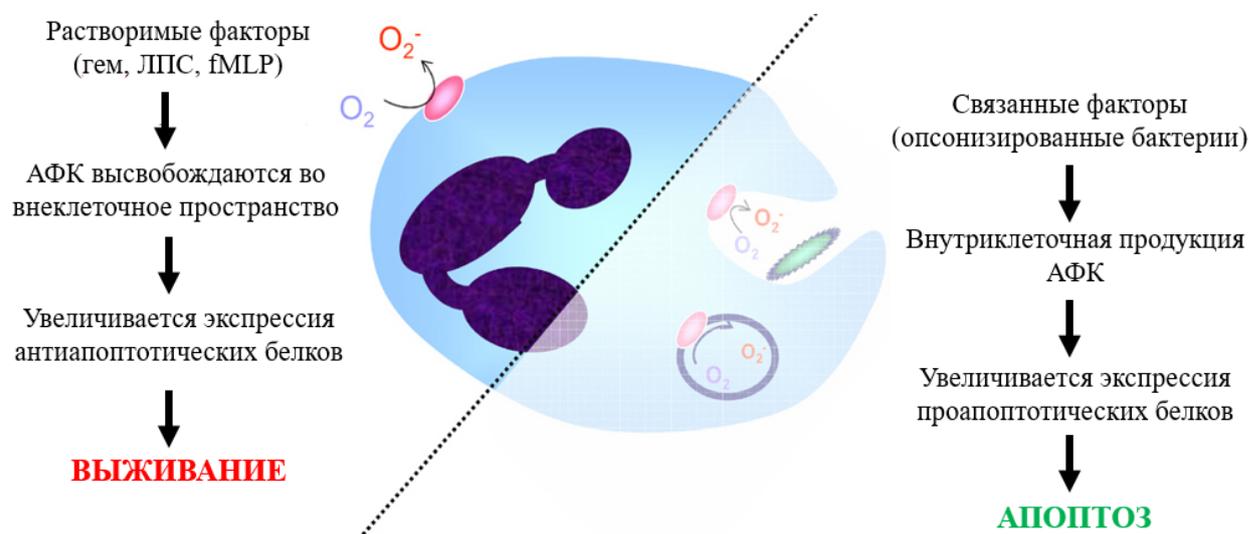


Рис. 11. Гипотетический механизм регуляции выживания нейтрофилов под действием АФК. Адаптировано из работы (Arruda & Varja-Fidalgo, 2009)

Однако не всегда повышение уровня АФК приводит к клеточной смерти нейтрофилов. Многие провоспалительные молекулы (ЛПС, лейкотриен В4, N-формилированные белки, интерлейкин-8 и другие) приводят к увеличению количества АФК, в том числе производимых НАДФН-оксидазой (Dewald and Baggiolini, 1985; Jones *et al.*, 1996). Однако в отсутствие фагоцитоза эти факторы не только не провоцируют апоптоз, но наоборот – откладывают его (R. W. G. Watson, 2002). Более того, известно, что ЛПС активирует транскрипционный фактор NF-κB, способствующий выживанию нейтрофилов, и эта активация зависит от концентрации АФК (Asehnoune, Strassheim, Mitra, Kim, & Abraham, 2004). Некоторые исследователи предлагают следующий механизм объяснения такой двойственности действия АФК: при фагоцитозе НАДФН-оксидаза производит АФК внутри клетки, а при активации растворимыми провоспалительными молекулами АФК выделяются в большей степени наружу – как представлено на рис. 11 (Arruda & Varja-Fidalgo, 2009). Иначе говоря, внеклеточные АФК стимулируют выживание нейтрофилов, а внутриклеточные – провоцируют апоптоз. Однако интересно отметить, что добавление пероксида водорода в концентрациях 200 мкМ и выше увеличивало уровень апоптоза у мышиных нейтрофилов (W. Liu, Liu, Li, & Rodgers, 2018). Это могло бы поставить под сомнение изложенную выше концепцию о взаимосвязи местонахождения АФК и

эффектом (выживание или апоптоз), но этими же исследователями было показано, что добавление внеклеточной перекиси стимулирует активацию НАДФН-оксидазы и продукцию ею супероксид-радикала (W. Liu *et al.*, 2018).

Подводя итоги, можно сказать, что в нейтрофилах отсутствие АФК откладывает апоптоз, но повышение их уровня может приводить как к увеличению, так и уменьшению выживаемости – и это зависит от множества различных факторов. Но это верно только для общих АФК клетки, а о вкладе митохондриальных АФК в процессы активации и апоптоза нейтрофилов практически ничего не известно, поскольку митохондрий в данных клетках довольно мало и долгое время им не уделяли должного внимания, считая их малофункциональными. Ситуация осложняется тем, что нет достаточно надёжных, стабильных и высокочувствительных маркеров для измерения именно митохондриальных АФК. Таким образом, изучение вклада митохондриальных АФК остаётся актуальной задачей современной науки.

5. Митохондрии как активаторы воспалительного ответа

Врождённый иммунный ответ, опосредованный в основном нейтрофилами, представляет собой первую линию защиты организма от патогенов. В отличие от адаптивного, врождённый иммунитет реагирует на вторжение чужеродных агентов незамедлительно, но число молекул, распознаваемых им, ограничено. К таким молекулам относятся уже упоминавшиеся выше DAMPs и PAMPs. Особенность последних заключается в том, что эти вещества необходимы для жизнедеятельности бактерий и не встречаются в эукариотическом организме-хозяине (Medzhitov, 2007).

Согласно общепринятой теории симбиогенеза, митохондрии сформировались примерно 1,5 миллиарда лет назад в ходе эндосимбиоза, когда предок современных эукариот «одомашнил» аэробную альфа-протеобактерию (Archibald, 2015). Несмотря на то, что митохондрии присутствуют в клетках эукариот как органеллы довольно длительное время, они сохранили многие черты бактерий: кольцевую ДНК с неметилованными CpG-островками, N-формилированные белки, фосфолипид кардиолипин во внутренней мембране (Osman *et al.*, 2011; Shadel and Clayton, 1997). Все эти молекулы распознаются клетками врождённого иммунитета как типичные образы патогенности (PAMPs). Таким образом, бактериальное прошлое митохондрий даёт основания врождённому иммунитету воспринимать их как возможные патогены.

Впервые воспалительное действие компонентов митохондрий (митохондриальных образцов опасности или митохондриальных DAMPs) было показано группой профессора Хаузера в 2010 году (Itagaki & Hauser, 2010). По мнению исследователей, стерильное воспаление, возникающее у пациентов с тяжёлыми травмами, может быть опосредовано поступлением содержимого митохондрий в кровь, где оно узнаётся нейтрофилами как образ опасности. Было показано, что добавление компонентов митохондрий к суспензии нейтрофилов стимулирует хемотаксис и дегрануляцию, в ходе которой происходило высвобождение металлопротеаз в среду культивирования. По-видимому, эти процессы были опосредованы увеличением фосфорилирования активационных киназ нейтрофилов – p38 и ERK1/2 (Itagaki & Hauser, 2010).

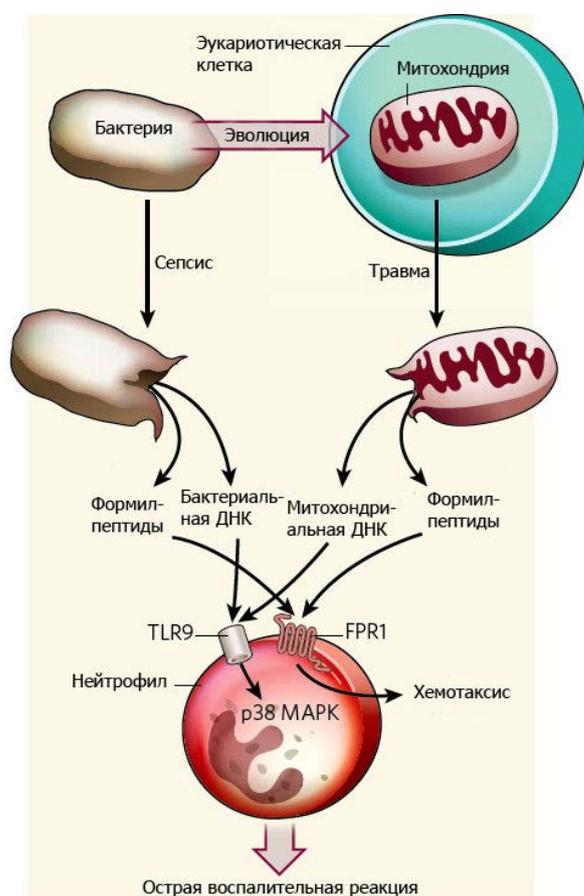


Рис. 12. Возможный механизм провоспалительного действия компонентов митохондрий. Адаптировано из (Calfee & Matthay, 2010).

Особую роль в развитии воспалительного ответа авторы уделяли N-формилированным белкам и митохондриальной ДНК (Zhang, Itagaki, & Hauser, 2010). Действительно, добавление ингибитора рецептора fMLP, с которым связываются подобные белки, значительно уменьшало активацию нейтрофилов (Itagaki & Hauser, 2010). Также было показано, что мтДНК может вызывать провоспалительную активацию нейтрофилов.

Авторы исследования считают, что это объясняется её схожим с бактериальной ДНК строением: кольцевая форма, другой профиль метилирования по сравнению с ядерной ДНК. Более того, авторы предполагают, что мтДНК распознаётся рецептором TLR9, в доказательство этому они приводят тот факт, что хлорокин, препятствующий закислению эндосом при их созревании, ингибировал активацию нейтрофилов под действием мтДНК (Zhang, Itagaki, *et al.*, 2010).

Описанные выше новаторские работы открывают широкие перспективы для дальнейших исследований. В частности, одна из актуальных проблем – определение вклада различных молекул (например, митохондриальной ДНК) в развитие воспалительного ответа под действием компонентов митохондрий. Кроме того, ещё предстоит установить, на какие аспекты жизнедеятельности нейтрофилов и других иммунных клеток могут влиять компоненты митохондрий – и каковы механизмы этого влияния.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работы использовались следующие реагенты:

- митохондриально-направленный антиоксидант SkQ1 (10-(6'-пластохинолил) децилтрифенилфосфоний), синтезированный в НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского;
- липофильный катион C₁₂TPP (децилтрифенилфосфоний), синтезированный в НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского;
- митохондриально-направленный прооксидант SkQN (10-(2'-нафтохинон) децилтрифенилфосфоний)
- митохондриально-направленный антиоксидант MitoTEMPO (Sigma, США);
- антиоксидант NAC (N-ацетильное производное L-цистеина, Sigma, США);
- антиоксидант Trolox – водорастворимый аналог витамина E (6-гидрокси-2,5,7,8 – тетраметилхроман – 2 – карбоновая кислота, Sigma, США);
- разобщитель окислительного фосфорилирования ДНФ (2,4-Динитрофенол, Sigma, США);
- разобщитель дыхания и окислительного фосфорилирования FCCP (карбонилцианид-(4-фторметокси)-фенилгидразон, Sigma, США);
- GM-CSF (Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, R&D Systems).

Все остальные реагенты произведены компанией Sigma (США), если не указано иное.

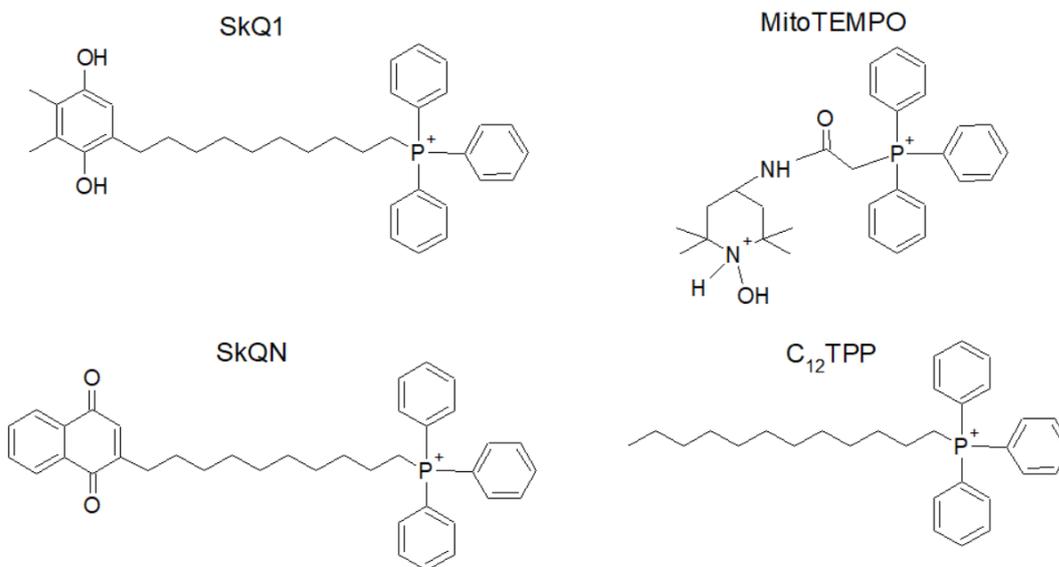


Рис. 13. Структурные формулы митохондриально-направленных антиоксидантов (SkQ1, MitoTEMPO), митохондриально-направленного прооксиданта SkQN и митохондриально-направленного разобщителя окислительного фосфорилирования C_{12} TPP.

3.1. Клеточные культуры.

В работе использовались 2 типа клеток: нейтрофилы человека, выделенные из венозной крови, и эндотелиальные клетки человека линии EA.hy 926.

3.1.1. Выделение нейтрофилов

Все эксперименты были одобрены этическим комитетом НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского. Процедура забора венозной крови проводилась по протоколам, одобренным Министерством здравоохранения Российской Федерации. Здоровые добровольцы давали письменное информированное согласие и гарантировали, что не сдавали кровь предыдущие две недели до эксперимента. Всего в эксперименте участвовало 13 добровольцев от 18 до 48 лет, из них 5 женщин и 8 мужчин.

Деионизованная вода, на которой готовились реактивы для работы с нейтрофилами, тестировалась на эндотоксины с помощью LAL (лизат амёбоцитов *Limulus*)-теста.

Гепаринизированную венозную кровь здоровых доноров смешивали с 5% раствором декстрана Т-500 (Pharmacosmos, Дания) в PBS в соотношении 4:1 (т. е. до конечной концентрации декстрана 1%) и оставляли при комнатной температуре на 30 минут для осаждения эритроцитов. Верхний слой плазмы (обогащенный лейкоцитами и лишенный эритроцитов) наслаивали на Фиколл (ПанЭко, Россия) с плотностью 1.077 г/мл и центрифугировали при комнатной температуре при 400g, 30 минут в центрифуге с отключённым режимом торможения. Затем удаляли супернатант и все дальнейшие процедуры проводили на льду и с использованием охлажденных растворов. Удаление примесных эритроцитов проводили с помощью ресуспендирования осадка в 2 мл деионизованной стерильной воды в течение 45 сек, а затем добавляли 2 мл 2-кратного PBS для восстановления тоничности. Центрифугировали при 200g, +4°C, 10 минут. Осаждённые нейтрофилы промывали PBS и ресуспендировали в культуральной среде (RPMI-1640 + 10% FBS) (Ferrante & Thong, 1980). Чистота популяции нейтрофилов, которую оценивали по прямому и боковому светорассеянию с помощью проточной цитометрии, составляла не менее 92%.

3.1.2. Эндотелиальные клетки линии EA.hy926

В данной работе использовалась клеточная линия EA.hy926 (гибридная линия, полученная путем слияния эндотелиальных клеток пупочной вены человека HUVEC (первый пассаж) с человеческой карциномой легких A549) (Edgell, McDonald, & Graham, 1983), любезно предоставленная Г.Ф. Судьиной (НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского). Клетки культивировали в среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, ПанЭко, Россия), содержащей 10% телячьей эмбриональной сыворотки FBS (HyClone, США), 4,5 г/л D-глюкозы, 0,3 г/л L-глутамина, 110 мг/л пирувата натрия, 3,75 г/л бикарбоната натрия, а также гипоксантин и тимидин (НТ) (ПанЭко, Россия), при pH 7,2-7,4 и температуре 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂. В ходе экспериментов клетки EA.hy926 растили на культуральных планшетах (6-, 12-луночные планшеты, Costar, США).

3.2. Выделение компонентов митохондрий (митохондриальных образцов опасности)

Клетки линии EA.hy926 растили на среде DMEM, содержащей 10% телячьей эмбриональной сыворотки, FBS (HyClone, США), pH 7,2-7,4, при температуре 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂, до достижения монослоя, после чего клетки снимали с помощью раствора трипсин-версена и суспендировали в среде DMEM с 10% сывороткой. После этого клетки осаждали центрифугированием при 600 g в течение 10 минут при 4°C. Осадок растворяли в буфере IBC (10 mM Tris-MOPS pH=7.8, 60 mM NaCl, 5% сахарозы, 10 mM ЭДТА) из расчета 10 мл на 1 матрас клеток (площадь матраса 225 см²). Затем клетки разрушали с помощью гомогенизатора Даунса, а обломки клеток осаждали центрифугированием (1 000 g, 10 минут), супернатант, содержащий митохондрии, аккуратно собирали.

Для приготовления суспензии разрушенных митохондрий к фракции митохондрий добавляли протеиназный ингибитор (Amresco, США) и проводили озвучивание во льду на аппарате Branson Sonifier 150 (Branson Ultrasonics Corporation, США) при 100%-ной амплитуде, 10 раз по 30 с, с интервалом в 30 с. Суспензию разрушенных митохондрий центрифугировали при 15 000 g (10 мин, 4°C), затем при 100 000 g (1 ч, 4°C) (Zhang, Itagaki, *et al.*, 2010). Концентрацию белков в супернатанте определяли по методу Брэдфорд с помощью Protein Assay Kit («BioRad», США).

3.3. Выделение митохондриальной ДНК и оценка чистоты

Стандартный препарат мтДНК выделяли из полученной фракции митохондрий с помощью набора «DNeasy Blood & Tissue» (Qiagen, США) согласно протоколу производителя. Дополнительную очистку препарата мтДНК проводили с помощью этанольной преципитации с ацетатом натрия. Осадок высушивали на воздухе и растворяли в деионизованной воде, затем дополнительно центрифугировали при 13 000 g в течение 30 мин и аккуратно отбирали супернатант. Концентрацию и чистоту полученного материала определяли спектрофотометрически, измеряя поглощение от 220 нм до 450 нм с помощью Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, США).

3.4. Выделение ядерной ДНК и оценка чистоты

Для выделения ядерной ДНК получали ρ^0 -клетки без митохондриальной ДНК по методике, описанной в статье (King & Attardi, 1996). Для этого растили клетки линии EA.hy926 на среде DMEM с 10%-ной телячьей эмбриональной сывороткой (FBS), а для индукции потери мтДНК добавляли бромистый этидий (20 нг/мл среды), уридин (50 мкг/мл среды) и пируват натрия (100 мкг/мл среды). Через 3 недели клетки снимали раствором трипсин-версена, центрифугировали при 600 g 10 минут и ресуспендировали в PBS. Затем выделяли ДНК с помощью набора «DNeasy Blood & Tissue» (Qiagen, США) согласно протоколу производителя. Оценку чистоты и переосаждение спиртом производили так же, как описано для мтДНК.

3.5. Вестерн-блот

После инкубации с тестируемыми активаторами нейтрофилы в концентрации 5 млн/мл лизировали в горячем буфере (62,5 мМ Tris-HCl, pH 6,8; 2% SDS; 10% глицерина; 50 мМ ДТТ, 0,01% бромфенолового синего) в течение 4 мин при 94°C. Белки разделяли в 12%-ном полиакриламидном геле и переносили на PVDF-мембраны (Amersham, США). Далее 5% БСА в буфере ТБСТ (25мМ Tris pH 7,4, 0,15М NaCl, 0,1% Tween20) блокировали сайты неспецифического связывания. Затем мембраны инкубировали в течение ночи при температуре +4°C с антителами в 5% растворе БСА/ТБСТ (антитела против β -актина, ГАФД, p38, фосфо-p38 (T180/Y182), фосфо-ERK1/2 (T202/Y204), все - Cell Signaling, США). Со вторыми антителами (против мышинных или кроличьих иммуноглобулинов, конъюгированными с пероксидазой хрена и разведенными в 5% растворе БСА/ТБСТ) мембраны инкубировали в течение 1 часа. Визуализацию проводили набором SuperSignal West Pico (ThermoFisher, США) с помощью рентгеновской плёнки или гель-

документирующей системы Bio-Rad ChemiDoc™ Touch. Для денситометрического анализа использовали программу ImageJ или программу Image Lab.

3.6. Зимография

Выделенные нейтрофилы (концентрация 1 млн/мл) обрабатывали fMLP, мтДНК или КМ в конечном объеме 0,5 мл в течение 1 ч при 37° в атмосфере 5% CO₂. Количество секретируемой нейтрофилами желатиназы MMP9 определяли по методу, описанном в работе (Bellosta *et al.*, 1998). После инкубации нейтрофилов отбирали среду и наносили образцы по 15 мкл на лунку. Электрофорез проводили при 4°C в 10% -ном полиакриламидном геле, содержащем 10% SDS и желатин (1 мг/мл). После завершения электрофореза полиакриламидные гели промывали 2,5% раствором Triton X-100 при комнатной температуре в течение 60 минут. Затем гели инкубировали в активационном буфере (50мМ Tris-HCl, pH=7.2, 150мМ NaCl, 10мМ CaCl₂, 1мМ ZnCl₂) в течение 12 часов при 37°C. Далее гели окрашивали 0,1% раствором Кумасси в 25%-ном метаноле и 7%-ной уксусной кислоте. Проявленные раствором Кумасси гели сканировали, результаты обрабатывали при помощи программы ImageJ.

3.7. Определение уровня активности каспазы-3

Нейтрофилы в концентрации 1 млн/мл были ресуспендированы в среде RPMI с добавлением 10% FBS. После инкубации с исследуемыми веществами (SkQ1, C₁₂TPP в течение 6 ч при 37°C) клетки лизировали буфером (10 мМ Tris-HCl, 5 мМ ЭДТА, 320 мМ сахараза, 1% Triton X100, 1 мМ PMSF, 1 мМ DTT) в течение 10 мин при 4°C, затем центрифугировали 5 мин при 4°C при 14 000 g. Супернатант переносили в лунки 96-луночного планшета. К образцам добавляли равный объем реакционной смеси (100 мМ HEPES, 10% сахараза, 0,2% CHAPS, 1 мМ PMSF, 1 мМ DTT, 100 мкМ флуоресцентного субстрата для каспазы-3 AC-DEVD-MCA («Peptide Institute, Inc.», Япония)). Реакцию проводили в течение 1 ч при 37°C. Степень активности каспазы-3 определяли флуориметрически на планшетном флуориметре «Thermo Fisher Scientific Fluoroskan Ascent» при длине волны 355–460 нм.

3.8. Выделение РНК из клеток линии EA.hy 926 и обратная транскрипция

Выделение мРНК проводили, используя протокол в наборе «Quick-RNA MiniPrep» (ZymoResearch, США). Затем с полученным материалом проводилась обратная

транскрипция для последующего анализа с помощью ПЦР в реальном времени. Обратная транскрипция проводилась с помощью набора SuperScript III (Invitrogen, США):

- готовили смесь: олиго(dT) (0,1 мкг/мкл) - 2 мкл, рандомных праймеров 1:1 (0,1 мкг/мкл) - 1 мкл, тотальная РНК, смесь 10 мМ dNTP - 1 мкл, деионизованной воды до 12 мкл;
- данную смесь прогревали при температуре 65°C в течение 5 минут, затем помещали в лёд;
- добавляли 5x-буфер для транскрипции - 4 мкл, 0,1М ДТТ – 2 мкл, обратную транскриптазу - 0,5 мкл, деионизованной воды - 0,5 мкл, инкубировали 10 мин при комнатной температуре для отжига рандомных праймеров и в течение 55 минут при температуре 43°C, затем при температуре 70°C в течение 15 мин для инактивации обратной транскриптазы.

3.9. ПЦР в реальном времени

ПЦР в реальном времени проводили в амплификаторе «BioRad iCycler» (условия приведены в таблице 3) со смесью следующего состава:

- 2,5x реакционная смесь (интеркалирующий краситель EvaGreen I (Синтол, Россия), пассивный референсный краситель ROX, Taq ДНК-полимераза, дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, 2,5x ПЦР буфер Б (KCl, Трис-HCl (pH 8.8), 6,25 мМ MgCl₂)) – 10 мкл;
- смесь праймеров (10 пМ прямого и обратного праймеров) – 0,5 мкл;
- деионизованная вода – 9,5 мкл;
- продукт обратной транскрипции – 5 мкл.

Последовательности праймеров к гену ICAM1 (от 5`-конца к 3`-концу):

hICAM1_F1: TGTCATCATCACTGTGGTAGC

hICAM1_R1: CTTGTGTGTTTCGGTTTCATGG

Последовательности праймеров к нормировочному гену Rpl32 (от 5`-конца к 3`-концу):

hRPL32_F1: CATCTCCTTCTCGGCATCA

hRPL32_R1: AACCCCTGTTGTCAATGCCTC

Таблица 3. Протокол ПЦР в реальном времени

Период	Время	Температура, °C	Число циклов
Первоначальная активация	3 мин	95	1
Денатурация	15 с	94	40
Отжиг	20 с	56	
Элонгация	20 с	72	
Получение кривой плавления	1 мин	56	1
	10 с	Каждые 10 с температура повышается на 0,5°C	78

При статистической обработке результаты анализа экспрессии нормировали на экспрессию гена белка большой субъединицы рибосомы *rpl32* (Cai *et al.*, 2007).

3.10. Флуоресцентная микроскопия

Нейтрофилы в концентрации 2 млн/мл рассаживали в конфокальные чашки с покровным стеклом, предварительно смоченные телячьей эмбриональной сывороткой для лучшей адгезии клеток. Нейтрофилы инкубировали с индукторами провоспалительной активации (ЛПС, fMLP) в течение 30 мин при 37°C, а затем ещё на 30 мин добавляли флуоресцентный аналог SkQ1 – SkQR1 (20 нМ), а также 200 нМ митохондриально-специфичного красителя MitoTracker Green (Invitrogen, США). Изображения получали на флуоресцентном микроскопе Axiovert 200M (Carl Zeiss, Германия), оборудованном камерой AxioCAM HRM.

3.11. Определение внутриклеточной продукция активных форм кислорода

Продукцию АФК оценивали с помощью красителя дихлорофлуоресцеина (DCF), флуоресценция которого пропорционально зависит от концентрации АФК. К нейтрофилам (концентрация 1 млн/мл) в среде RPMI с 10% FBS, преинкубированным с антиоксидантами, прооксидантами и разобщителями в течение 1 часа, добавляли провоспалительные факторы и инкубировали 30 мин при 37°C. Затем добавляли DCF до конечной концентрации 5 мкМ, инкубировали ещё 30 мин при 37°C, затем отмывали в

холодном буфере (10 мМ HEPES, 120 мМ NaCl, 2,5 мМ CaCl₂, pH = 7.4) и держали во льду до измерений. Уровень АФК определяли по флуоресценции DCF с помощью проточного цитофлуориметра Beckman Coulter CytoFLEX.

3.12. Оценка уровня апоптоз нейтрофилов

Апоптоз нейтрофилов оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии, а также оценивали морфологию ядер с помощью флуоресцентной микроскопии.

3.12.1. Определение уровня апоптоза проточной цитофлуориметрией

Нейтрофилы инкубировали с провоспалительными агентами (ЛПС), антиоксидантами или разобшителями в течение 22 часов при 37°C в увлажнённом CO₂-инкубаторе. Затем клетки центрифугировали при 400 g в течение 5 минут и ресуспендировали осадок в 70 мкл буфера (10 мМ HEPES, 120 мМ NaCl, 2,5 мМ CaCl₂, pH = 7.4). К каждой пробе добавляли 2,5 мкл аннексина V, конъюгированного с флуоресцентным красителем FITC (ThermoFisher, США) и оставляли на 25 минут при 37°C. Далее добавляли иодид пропидия до конечной концентрации 10 мкг/мл, инкубировали ещё 5 минут, после чего анализировали 50 тысяч клеток с помощью проточного цитофлуориметра Beckman Coulter CytoFLEX. Апоптотическими считали аннексин V-положительные и пропидий иодид-отрицательные клетки (Rieger, Nelson, Konowalchuk, & Barreda, 2011).

3.12.2. Оценка морфологии ядер

К нейтрофилам, инкубированным с митохондриально-направленным антиоксидантом SkQ1 в течение 22 часов при 37°C, добавляли раствор Hoechst 33342 (5 мкг/мл) на 30 минут. Изображения получали на флуоресцентном микроскопе Axiovert 200M (Carl Zeiss, Германия), оборудованном камерой AxioCAM HRM.

3.13. Оценка степени дегрануляции нейтрофилов (секреторной активности)

Дегрануляцию нейтрофилов оценивали по увеличению на поверхности клеток молекул CD11b (компонент мембран специфических, желатиназных и четвертичных гранул) и CD66b (компонент мембран специфических гранул) с помощью проточной цитофлуориметрии. Клетки инкубировали с соответствующими веществами в течение 30 минут при 37°C, затем добавляли 2,5 мкл антител к CD11b, конъюгированных с флуоресцентным красителем FITC (ThermoFisher, США), и 0,5 мкл антител к CD66b,

конъюгированных с флуоресцентным красителем AlexaFluor647 (ThermoFisher, США), и оставляли на 30 минут во льду. Затем анализировали 50 тысяч клеток с помощью проточного цитофлуориметра Beckman Coulter CytoFLEX.

3.14. Статистическая обработка данных

Статистическую обработку результатов проводили в программе Statistica 6.0. Данные представлены в виде средних значений \pm стандартная ошибка среднего или в виде медианы и межквартильного размаха. Статистическую значимость определяли используя непараметрический критерий Манна-Уитни для малых выборок. Значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Митохондриальная ДНК как индуктор провоспалительной активации нейтрофилов

4.1.1. Компоненты митохондрий вызывают провоспалительную активацию нейтрофилов человека и снижают уровень их апоптоза

Тяжёлые травмы могут приводить к возникновению так называемого синдрома системного воспалительного ответа (ССВО), схожего по симптомам с сепсисом, но протекающего стерильно. Одной из основных причин ССВО считаются разрушающиеся при травме митохондрии, содержимое которых попадает в кровь (Zhang, Raoof, *et al.*, 2010)

В ходе эволюции митохондрии произошли от бактерий и, несмотря на миллионы лет сосуществования с эукариотическими клетками в качестве её органелл, сохранили многие черты, присущие бактериям (N-формилированные белки, фосфолипид кардиолипин, кольцевая ДНК, отличающаяся от ядерной профилем метилирования). Поэтому при разрушении митохондрий в кровоток попадает множество молекул, похожих на бактериальные образы опасности, что может приводить к развитию воспаления, поскольку данные молекулы распознаются клетками иммунной системы как чужеродные агенты.

Несколько лет назад было показано, что компоненты митохондрий (митохондриальные образы опасности) увеличивают продукцию интерлейкина-8, высвобождают матриксную металлопротеазу MMP8 и стимулируют хемотаксис (Zhang, Raoof, *et al.*, 2010).

Митохондриальные образы опасности в данной работе получали разрушением митохондрий клеток линии Ea.hy926 и последующим удалением крупных мембранных обломков, то есть компоненты митохондрий представляют собой содержимое матрикса митохондрий: там должны находиться растворимые белки и другие молекулы (например, АТФ), в том числе и митохондриальная ДНК. Важно отметить, что препарат КМ, скорее всего, не должен содержать в значительных количествах кардиолипин и митохондриальные N-формилированные белки, поскольку они входят в состав мембран, которые осаждались центрифугированием.

В рамках нашего исследования мы изучали влияние митохондриальных образов опасности на активацию нейтрофилов. Нами использовались КМ, полученные из

эндотелиальных клеток человека линии EA.hy926 по методу, описанном группой проф. Хаузера (Zhang, Raouf, *et al.*, 2010). Мы обнаружили, что КМ вызывают дегрануляцию нейтрофилов и экспонирование на поверхности молекул CD11b и CD66b, участвующих в адгезии и миграции нейтрофилов (Рис. 14).

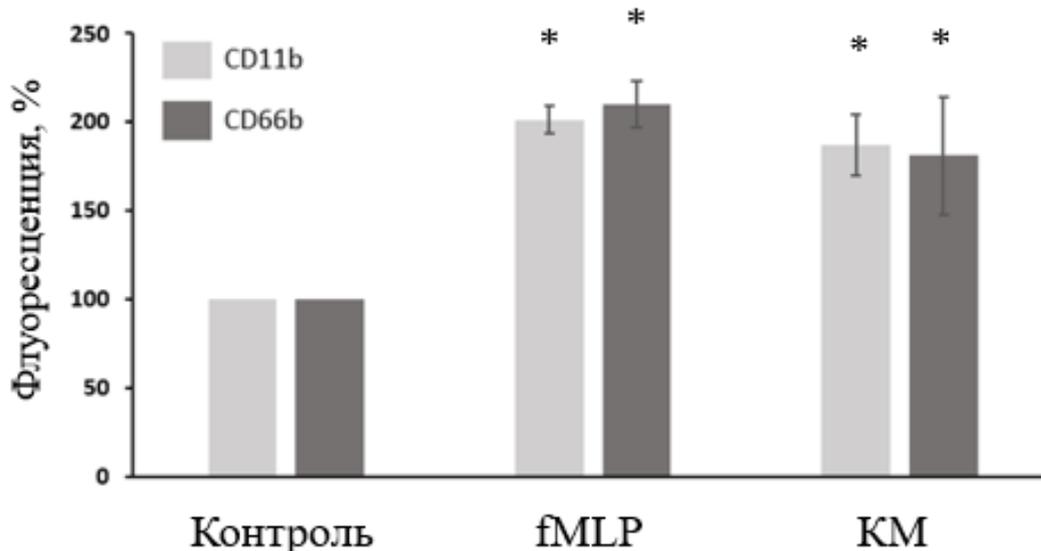


Рис. 14. Компоненты митохондрий (КМ) увеличивают экспонирование молекул CD11b и CD66b на поверхности нейтрофилов. Нейтрофилы инкубировали в течение 30 мин в среде без активаторов (контроль), в присутствии 10 нМ fMLP (положительный контроль) или КМ (50 мкг общего белка/мл). Представлены данные проточной цитофлуориметрии. N=6; * p<0.05 по критерию Манна –Уитни.

Также мы обнаружили, что КМ значительно – более чем на 20% – понижали уровень спонтанного апоптоза нейтрофилов (Рис. 15). В совокупности эти данные указывают на то, что растворимые компоненты митохондрий активируют нейтрофилы и увеличивают продолжительность их жизни, что, разумеется, способствует развитию воспаления. Подобные процессы (дегрануляция нейтрофилов, уменьшение апоптоза) наблюдаются при различных инфекциях. Более того, оценка уровня экспрессии молекул CD11b, применяемая нами для измерения активации нейтрофилов, широко используется в мировой медицинской практике для диагностики множества патологических состояний, сопровождающихся воспалением (бактериальные и вирусные инфекции, диабетическая ангиопатия, ревматоидный артрит, неонатальный сепсис) (Lilius and Nuutila, 2012; Lioté *et al.*, 1996; Mastej and Adamiec, 2008; Weirich *et al.*, 1998). Таким образом, наши данные подтверждают и дополняют результаты, полученные группой Хаузера: образы опасности (эндогенные сигналы опасности), высвобождающиеся при разрушении митохондрий,

способны вызывать воспалительный ответ за счёт активации нейтрофилов и увеличения продолжительности их жизни.

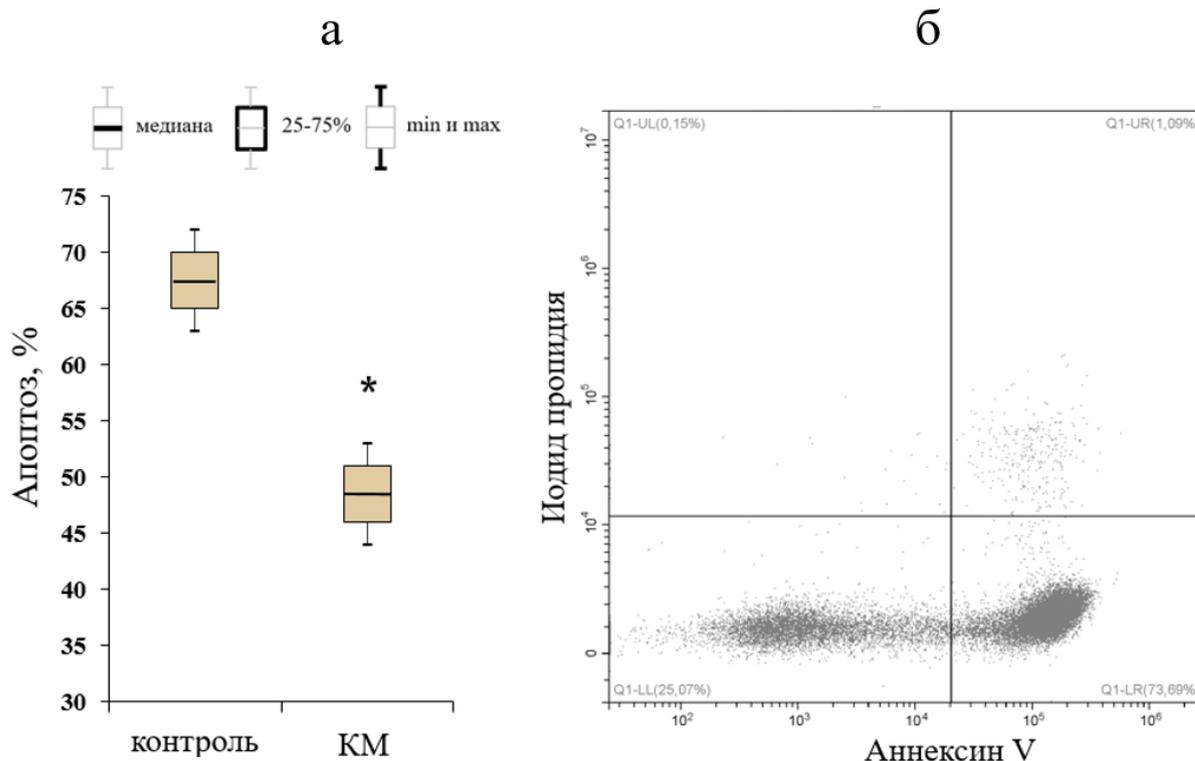


Рис. 15. KM уменьшают уровень спонтанного апоптоза нейтрофилов. а – результаты анализа данных проточной цитофлуориметрии, б – результат типичного эксперимента (контроль).

Нейтрофилы инкубировали в среде без активаторов и в присутствии KM (50 мг/мл) в течение 24 часов. Уровень апоптоза измеряли окрашиванием аннексином и иодидом пропидия.

Апоптотическими считали аннексин-положительные и пропидий иодид-отрицательные клетки.

N=5; * $p < 0.01$ по критерию Манна –Уитни.

4.1.2. Очищенная митохондриальная ДНК не вызывает провоспалительную активацию нейтрофилов

Среди всех митохондриальных образцов опасности особый интерес представляет митохондриальная ДНК. Этому есть несколько причин: во-первых, имеются данные о корреляции между наличием мтДНК в крови и развитием различных патологических состояний у человека и на животных моделях (сердечная недостаточность (Oka *et al.*, 2012), дистрофия сетчатки (Dib *et al.*, 2015), ССВО в результате травм (Balogh, McIlroy, Smith, & Hansbro, 2013) и другие (Nakahira, Hisata, & Choi, 2015)); во-вторых, количественную оценку содержания мтДНК в крови было бы удобно использовать как прогностический маркер – тем более, что некоторые исследования показали связь между уровнем внеклеточной ДНК в крови и смертностью (Yamanouchi *et al.*, 2013).

Однако оставалось неясным, ответственна ли мтДНК за развитие патологических состояний или же она просто является сопутствующим фактором других процессов, например, некроза клеток. Для прояснения этого вопроса мы выделяли мтДНК из эндотелиальных клеток человека линии EA.hy926 по протоколу, использованному Хаузером и соавторами (Zhang, Itagaki, *et al.*, 2010) (см. Материалы и методы), но неожиданно обнаружили, что такие препараты содержат некие примеси – об этом свидетельствует увеличение поглощения при 230 нм и уменьшение соотношения коэффициентов поглощения $A_{260/280}$ (кривая 1, Рис. 16). Такой спектр может свидетельствовать о загрязнении образцов низкомолекулярными органическими и неорганическими веществами (углеводами, липидами, фенолами и их производными, тиоцианатами и другими), а также белками (Desjardins & Conklin, 2010). Однако мы не ставили задачей изучение состава этих примесей. Поэтому мы ввели стадию дополнительной очистки, а именно переосаждение спиртом, чем добились получения чистых препаратов мтДНК (кривая 2, Рис. 16). В дальнейшей работе мы использовали как препараты стандартного выделения, так и препараты после дополнительной очистки.

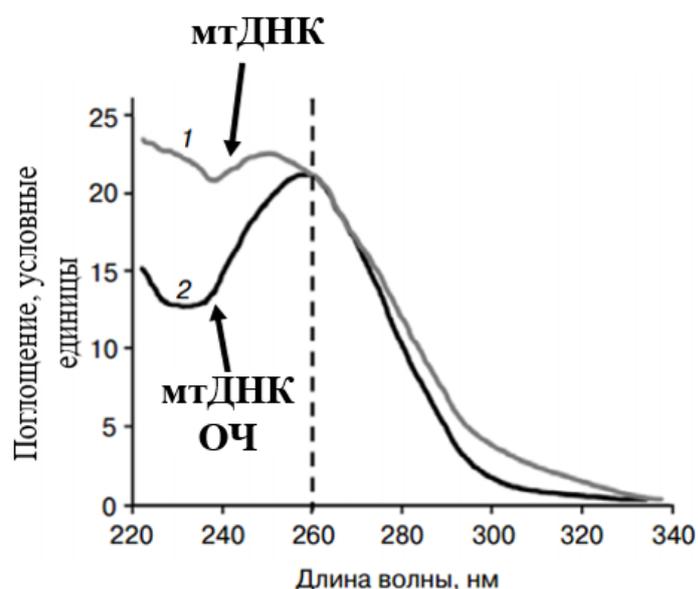


Рис. 16. УФ-спектр поглощения препарата мтДНК, выделенного стандартными методами, (кривая 1) и после дополнительной очистки (кривая 2).

Мы сравнили действие обоих препаратов мтДНК, а также КМ на фосфорилирование MAP-киназы p38, - основного участника MAP каскада, который быстро активируется в ответ на провоспалительные сигналы (Kim & Haynes, 2013). В течение 10 минут КМ и мтДНК стандартной очистки заметно увеличивали уровень фосфорилирования киназы

p38, в то время как дополнительно очищенная мтДНК практически не влияла на этот параметр (Рис. 17).

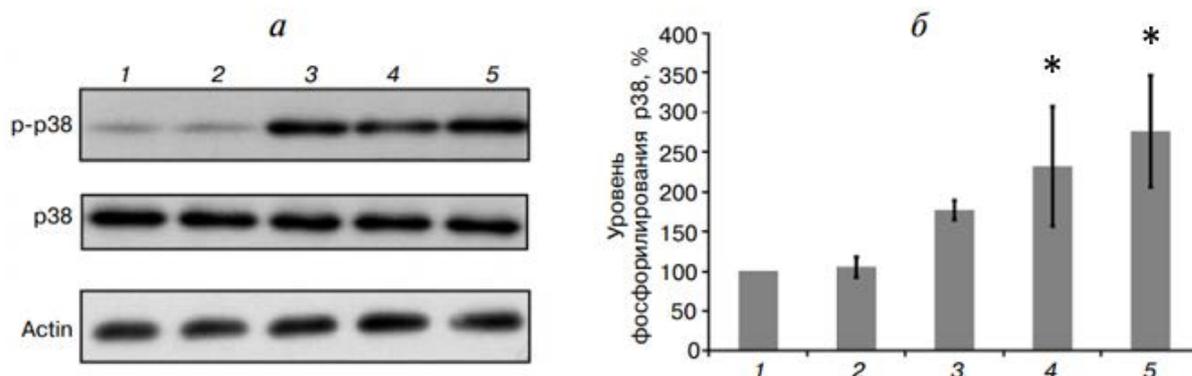


Рис. 17. Дополнительно очищенная мтДНК не вызывает фосфорилирования MAP-киназы p38 в нейтрофилах человека. *а* – Уровень Фосфо-p38 через 10 мин после воздействия (результаты типичного эксперимента); *б* – результаты денситометрического анализа вестерн-блотов. 1 – Контроль без активаторов; 2 – дополнительно очищенный препарат мтДНК (5 мг/мл); 3 – мтДНК, выделенная стандартным методом (5 мг/мл); 4 – препарат КМ (50 мг/мл); 5 – fMLP (100 нМ) (положительный контроль). N=4; * $p < 0.05$ по критерию Манна –Уитни.

Ещё одним широко известным маркером активации нейтрофилов служит желатиназа MMP9, которая высвобождается из гранул лейкоцитов и облегчает их миграцию в ткани. Мы исследовали секрецию в среду нейтрофилами матричной металлопротеиназы MMP9 под действием КМ и мтДНК. Как и в экспериментах с дегрануляцией, КМ активировали нейтрофилы и вызывали высвобождение MMP9 в культуральную среду, но в случае дополнительно очищенной мтДНК такого не наблюдалось (Рис. 18).

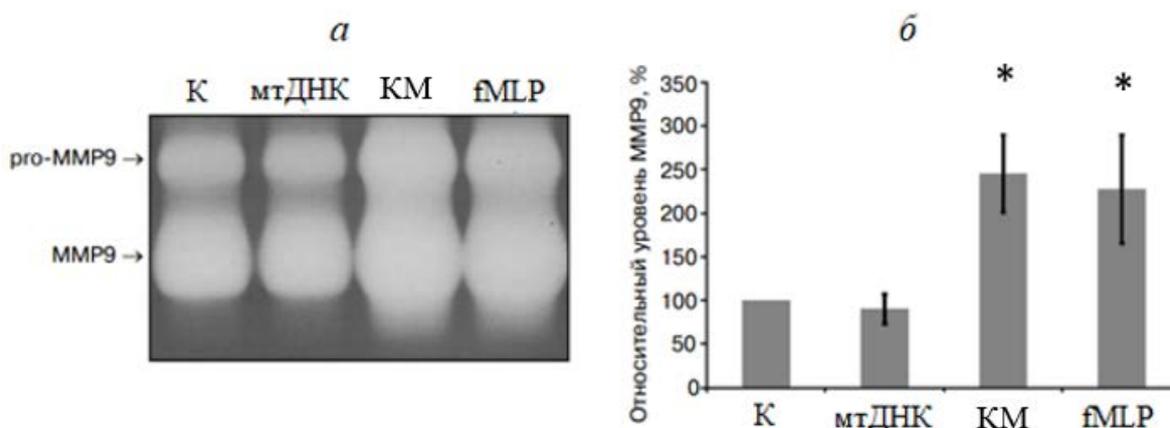


Рис. 18. Дополнительно очищенная мтДНК не влияет на секрецию MMP9 в нейтрофилах человека. *а* - зимограмма культуральной среды препаратов через 45 мин инкубации с индукторами (результаты типичного эксперимента); *б* – результаты денситометрического анализа

зимограмм. Нейтрофилы инкубировали в среде без активаторов (контроль, К), с очищенным препаратом мтДНК (50 мкг/мл), с КМ (50 мкг/мл) или с положительным контролем (fMLP, 10 нМ). N=5; * p<0.05 по критерию Манна –Уитни.

Таким образом, наши данные подтверждают, что компоненты митохондрий распознаются клетками иммунной системы (нейтрофилами) как образы опасности. Тем не менее, чистая мтДНК, считающаяся одним из основных митохондриальных образов опасности (Zhang, Itagaki, *et al.*, 2010), не вызывает высвобождения желатиназы из гранул и фосфорилирования киназы p38. Как известно, неметилированные CpG-последовательности бактериальной ДНК узнаются рецепторами TLR9, которые расположены, в основном, не на поверхности нейтрофилов, а на мембранах эндосом (D. Lindau *et al.*, 2013). Возможно, что в отсутствие неких примесей, которые мы удаляли с помощью дополнительной очистки, мтДНК не способна проникать внутрь нейтрофилов. Также возможно, что дело вовсе не в мтДНК, а в примесях, которые содержатся в препаратах стандартной очистки – они также могут вызывать активацию нейтрофилов.

4.1.3 Праймирование нейтрофилов с помощью GM-CSF вызывает провоспалительную активацию под действием митохондриальной ДНК

Механизм распознавания нейтрофилами чужеродной ДНК изучен недостаточно. Ранее полагали, что TLR9 является основным сенсором, узнающим последовательности с неметилированными CpG-участками, типичными для бактериальной ДНК. Однако последние данные указывают на то, что TLR9 также способен узнавать ДНК, в которых отсутствуют CpG-участки (Ishii & Akira, 2006). Более того, некоторыми исследователями предполагается TLR9-независимый путь активации иммунных клеток ДНК, однако неясно, связывается ли митохондриальная ДНК с такими рецепторами (D. Lindau *et al.*, 2014; D. A. Martin & Elkon, 2006; Paunel-Görgülü *et al.*, 2017). Известно, что в интактных нейтрофилах TLR9 находится в ЭПС, и только после активации (например, стимуляции CpG-содержащими олигонуклеотидами) он переходит в эндолизосомы, где может взаимодействовать с эндоцитированной или фагоцитированной мтДНК (Leifer *et al.*, 2004). Интересно, что перемещение TLR9 из ЭПС в эндосомы может осуществляться даже в клетках, у которых отсутствует адаптерный белок MyD88 (Latz *et al.*, 2004). Как именно TLR9 связывается с ДНК - до сих пор неясно, поскольку неизвестен механизм попадания мтДНК внутрь клетки. Возможно, что TLR9 взаимодействует с ДНК ещё до перехода в эндосомы, либо существуют некие дополнительные молекулы, которые улавливают CpG-содержащие олигонуклеотиды и запускают транслокацию TLR9 в эндосомы.

Для иммунных клеток и, в частности, нейтрофилов, известен такой феномен как праймирование. Праймированием называется процесс, в ходе которого нейтрофил взаимодействует с определённым фактором, не вызывающим активации, но повышающем его чувствительность к последующей провоспалительной активации, то есть сенсibiliзирующий. Частный случай праймирования НАДФН-оксидазы был описан в разделе 2.3 (Окислительный взрыв). Праймирующим фактором может являться провоспалительный агент в очень низких концентрациях, недостаточных для активации. После праймирования нейтрофил быстрее и сильнее отвечает на активирующий стимул, чем без праймирования. Праймирующий эффект на нейтрофилы известен для таких веществ, как GM-CSF, TNF (McLeish *et al.*, 1998), интерлейкин-8 (Daniels, Finnen, Hill, & Lackie, 1992), интерферон γ (Tennenberg, Fey, & Lieser, 1993) и некоторых других.

Мы предположили, что в нашей системе GM-CSF может оказывать так называемое праймирующее действие на нейтрофилы, благодаря которому они будут отвечать на внеклеточную ДНК. Это предположение было обусловлено, в частности, тем фактом, что под действием GM-CSF увеличивается провоспалительная активация нейтрофилов в ответ на бактериальную ДНК (Bass *et al.*, 2008). Кроме того, GM-CSF – это один из важнейших факторов, влияющих на увеличение экспрессии мРНК TLR9 (O'Mahony *et al.*, 2008; Hayashi *et al.*, 2003). Более того, GM-CSF способен увеличивать фагоцитоз в нейтрофилах, что, вероятно, позволяет внутриклеточному TLR9 распознавать большее количество интернализированной ДНК (Hellberg *et al.*, 2011).

Для того, чтобы проверить, оказывает ли GM-CSF праймирующее действие на нейтрофилы, взаимодействующие с внеклеточной ДНК, мы преинкубировали нейтрофилы с GM-CSF в концентрации 2 нг/мл, а затем добавляли дополнительно очищенные мтДНК или яДНК. Инкубация с GM-CSF в указанной концентрации, а также с чистыми мтДНК или яДНК в концентрациях 10 мкг/мл не увеличивала фосфорилирование MAP-киназы p38 (Рис.19). Однако добавление мтДНК после инкубации с GM-CSF приводило к значительному увеличению фосфорилирования p38. Схожий эффект наблюдался и в случае GM-CSF и яДНК (Рис.19).

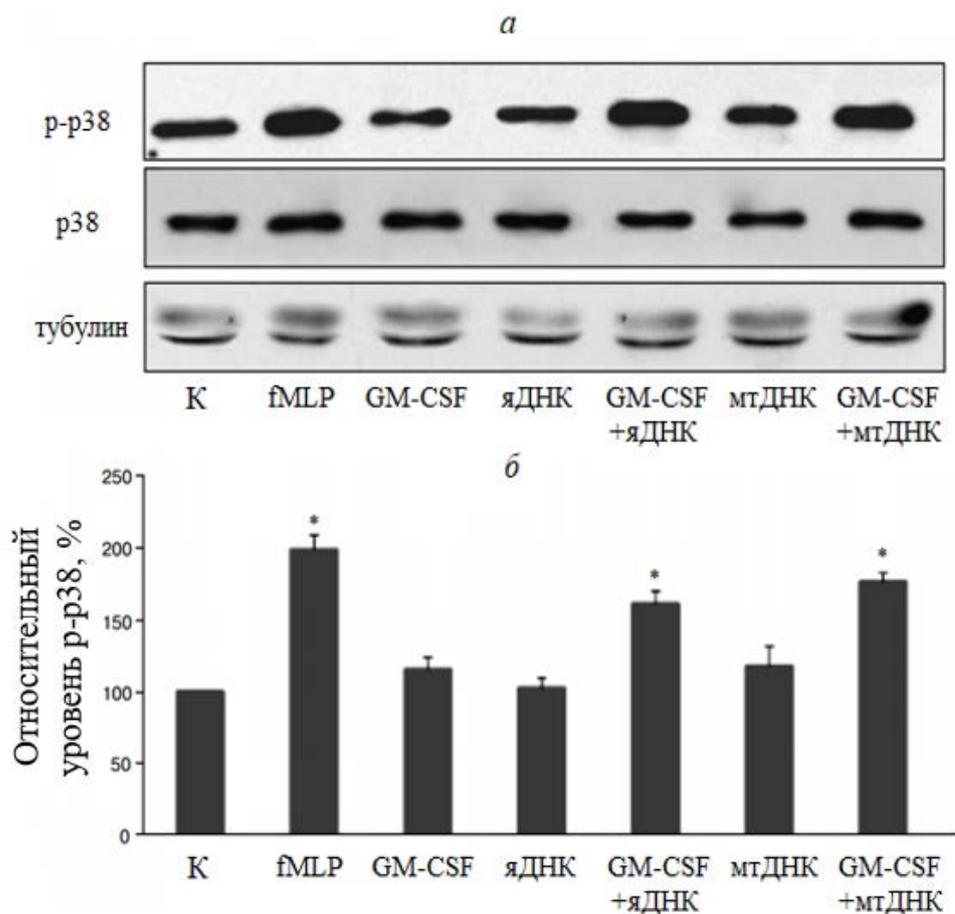


Рис. 19. GM-CSF увеличивает фосфорилирование MAP-киназы p38 под действием мтДНК и яДНК в нейтрофилах человека. Нейтрофилы инкубировали в среде без активаторов (контроль, К), в присутствии 10 нМ fMLP (положительный контроль), GM-CSF (2 нг/мл) или мтДНК и яДНК (10 мкг/мл). В случае экспериментов с праймированием нейтрофилы преинкубировали с GM-CSF в течение 10 минут, а затем добавляли мтДНК и яДНК.

a – репрезентативный вестерн-блот, *б* - результаты денситометрического анализа ($n=5$, $*p < 0.01$ по критерию Манна –Уитни).

Затем мы изучили влияние GM-CSF на дегрануляцию нейтрофилов под действием мтДНК и яДНК. Сходным образом GM-CSF, а также дополнительно очищенные митохондриальная и ядерная ДНК в тех же концентрациях, что и в предыдущем опыте, не увеличивали экспонирование молекул CD11b и CD66b на поверхности нейтрофилов (Рис. 20). Зато преинкубация с GM-CSF заметно увеличивала экспонирование молекул CD11b и CD66b в ответ на действие мтДНК и, в меньшей степени, яДНК.

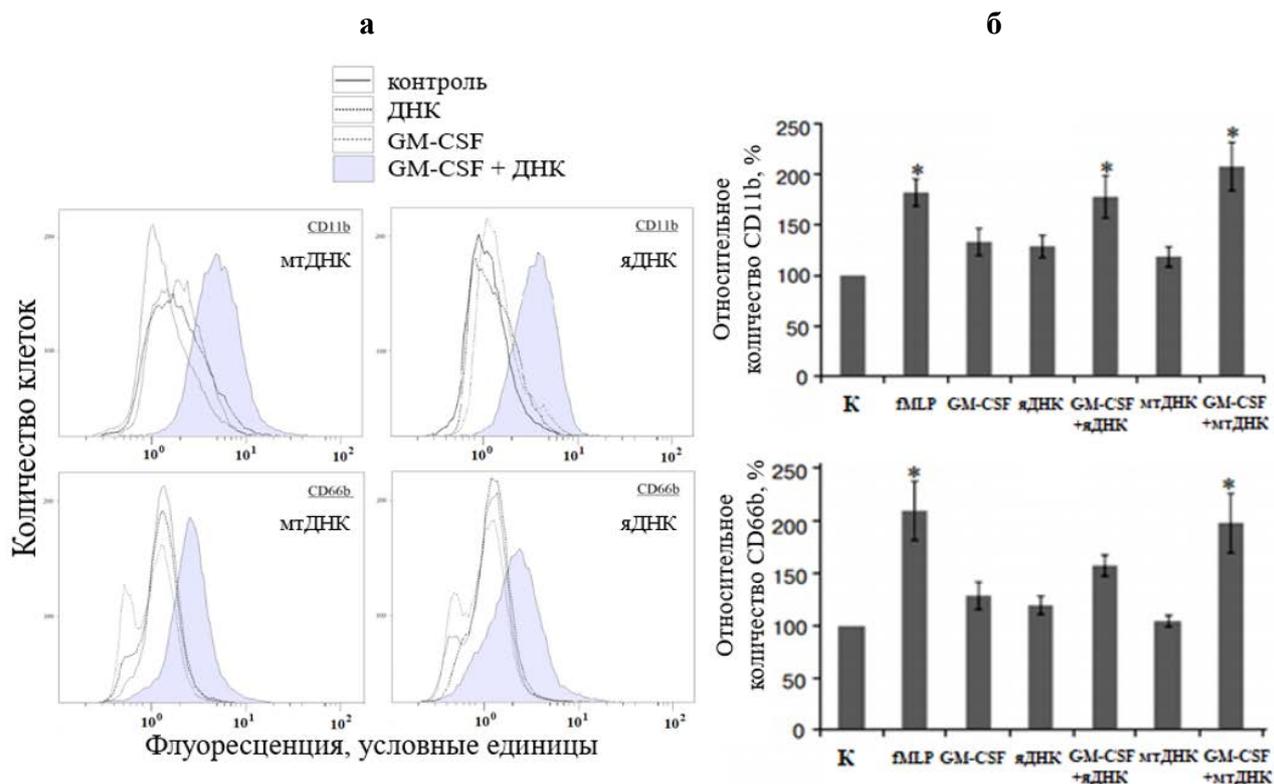


Рис. 20. GM-CSF увеличивает экспонирование молекул CD11b и CD66b на поверхности нейтрофилов под действием мтДНК и яДНК. Нейтрофилы инкубировали в среде без активаторов (контроль, К), в присутствии 10 нМ fMLP (положительный контроль), GM-CSF (2 нг/мл) или мтДНК и яДНК (10 мкг/мл). В случае экспериментов с праймированием нейтрофилы преинкубировали с GM-CSF в течение 20 минут, а затем добавляли мтДНК и яДНК в тех же концентрациях. а – репрезентативные графики, полученные с помощью проточной цитофлуориметрии, б – гистограмма анализа данных (n = 4, * p < 0.05).

Активационное влияние яДНК на нейтрофилы человека оказалось достаточно неожиданным результатом. Мы исходили из предположения, что мтДНК, так же, как и бактериальная, распознаётся TLR9, связывающим неметилированные участки ДНК. Если считать, что GM-CSF увеличивает количество этого рецептора в нейтрофилах, то наблюдаемая нами провоспалительная активация преинкубированных с GM-CSF нейтрофилов в ответ на мтДНК представляется вполне логичным следствием. Однако яДНК, в отличие от мтДНК, специфически метилирована, и не должна узнаваться TLR9 даже в нейтрофилах, праймированных GM-CSF. В работах упоминавшегося выше профессора Хаузера яДНК не вызывала активации нейтрофилов, в отличие от мтДНК (Zhang, Itagaki, *et al.*, 2010). Другие исследователи показали, что ядерная ДНК, в отличие от митохондриальной и бактериальной, не влияет на жизнеспособность нейтрофилов, однако на продукцию интерлейкина-6 не влияли ни яДНК, ни мтДНК (Bhagirath *et al.*, 2015). Более того, все три типа ДНК (ядерная, митохондриальная и бактериальная)

оказывали одинаковый эффект на агрегацию тромбоцитов, что тоже оказалось непредвиденным для авторов исследования, поскольку они предполагали (так же, как и мы в нашей работе), что механизм действия внеклеточной ДНК связан с TLR9, и известно, что данный рецептор на нейтрофилах способен узнавать неметилированные олигонуклеотиды (Bhagirath *et al.*, 2015). Таким образом, данные о влиянии яДНК на активацию нейтрофилов противоречивы, и этот вопрос требует дальнейшего изучения.

Стоит отметить, что нейтрофилы – это крайне чувствительные к любым манипуляциям клетки, поэтому даже само их выделение из венозной крови может их активировать и/или приводить к некоторым артефактам. Поэтому для того, чтобы оценить релевантность нашей модели на выделенных нейтрофилах, мы провели такой же эксперимент с цельной кровью. Венозную кровь здоровых добровольцев собирали в гепаринизированные пробирки, после чего добавляли GM-CSF, митохондриальную и ядерную ДНК по той же схеме, что и в предыдущих опытах. Затем из цельной крови выделяли фракцию нейтрофилов и анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии и флуоресцентных антител к CD11b и CD66b. Как и в предыдущем опыте на выделенных нейтрофилах, мтДНК, яДНК и GM-CSF не вызывали значимого увеличения экспрессии CD11b и CD66b на поверхности нейтрофилов (Рис. 21). Однако преинкубация с GM-CSF заметно усиливала ответ нейтрофилов на мтДНК и яДНК (Рис. 21).

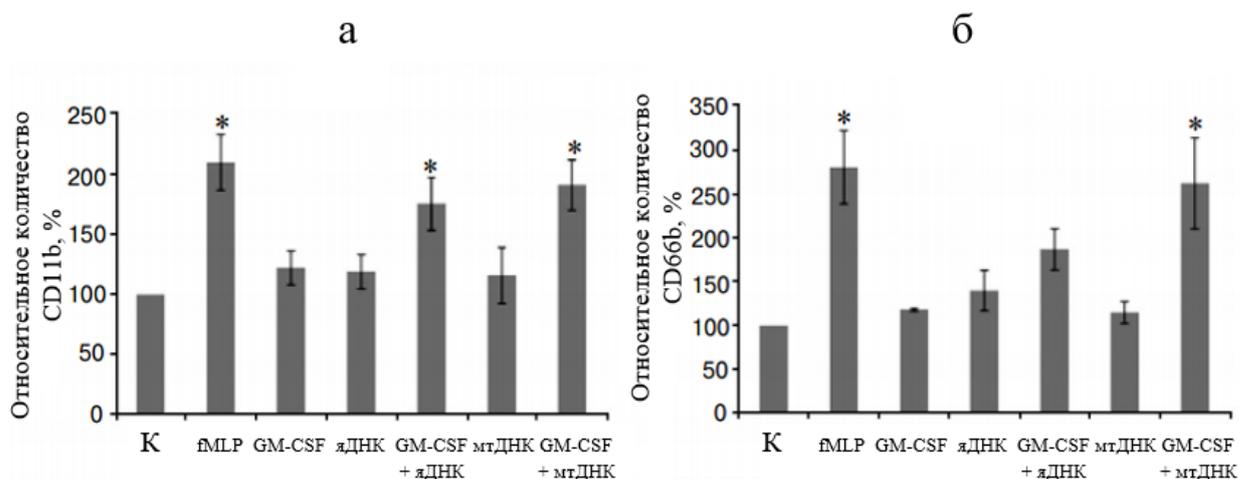


Рис. 21. GM-CSF увеличивает экспонирование молекул CD11b и CD66b на поверхности нейтрофилов под действием мтДНК и яДНК в цельной крови. Эксперимент проводили так же, как указано в подписи к рис. 20 (n = 4, * p < 0.01).

Таким образом, наши результаты свидетельствуют о том, что очищенные препараты митохондриальной и ядерной ДНК не вызывают активацию нейтрофилов. Однако праймирование с GM-CSF приводит к провоспалительной активации нейтрофилов после

инкубации с митохондриальной и, в меньшей степени, с ядерной ДНК. В цельной крови, которая содержит множество различных факторов, способных влиять на активацию нейтрофилов, результаты с праймированием GM-CSF полностью совпадают с результатами на выделенных нейтрофилах.

Учитывая полученные данные, можно сказать, что сама по себе внеклеточная митохондриальная ДНК не приводит к воспалительному ответу в форме активации нейтрофилов человека. К таким же выводам на основе своих независимых данных пришли и другие исследователи: так, Hazeldine с соавторами показали, что инкубация нейтрофилов с мтДНК в концентрациях 1 и 5 мкг/мл не увеличивает экспонирование L-селектинов на поверхности нейтрофилов, а также не увеличивает фосфорилирование ни p38, ни ERK1/2 (Hazeldine, Hampson, Oropku, Foster, & Lord, 2015). Особо стоит отметить, что в данном исследовании так же, как и в нашей работе, проводилась спектрофотометрическая оценка чистоты препаратов мтДНК.

Данные других групп, свидетельствующие о том, что мтДНК вызывает активацию нейтрофилов, не противоречат нашим данным, поскольку другие исследователи не постулировали отсутствие примесей в своих препаратах ДНК, а эти примеси могли оказывать то самое праймирующее действие, которые мы наблюдали. Более того, возможные примеси N-формилированных белков, содержащиеся в препаратах ДНК, могли активировать нейтрофилы независимо от мтДНК (Marutani *et al.*, 2015). Так, о наличии N-формилированных белков в своих препаратах КМ утверждает и проф. Хаузер, при этом его методика выделения мтДНК не исключает попадания этих белков и в препараты ДНК.

4.1.4. Механизм действия внеклеточной ДНК на нейтрофилы человека связан с TLR9

Как уже упоминалось выше, точно не известно, через какой рецептор мтДНК способна активировать нейтрофилы. Мы исходили из предположения, что внеклеточная ДНК связывается с TLR9, рецептором бактериальной и вирусной ДНК. В пользу этого предположения есть несколько аргументов. Во-первых, GM-CSF увеличивает количество мРНК и белка TLR9 (O'Mahony *et al.*, 2008), что согласуется с нашими данными, в соответствии с которыми GM-CSF увеличивает ответ нейтрофилов на мтДНК (Рис. 18-20). Во-вторых, выраженность воспалительных реакций после инъекции мтДНК у нокаутных мышей с делециями генов TLR9 и его адаптерного белка MyD88 была значительно меньше, чем у мышей дикого типа (Wei *et al.*, 2015). Внутривенная инъекция КМ с

большим содержанием мтДНК приводила к мощному ССВО, который был гораздо менее выражен у мышей с делецией гена TLR9 (Tsuji *et al.*, 2016). Мыши *tlr9^{-/-}* также обладают большей выживаемостью по сравнению с мышами дикого типа при тяжелой почечной ишемии-реперфузии, вызванной циркулирующей в кровотоке мтДНК (Bakker *et al.*, 2015). Наконец, имеются данные, что в некоторых иммунных клетках, в том числе в нейтрофилах, TLR9 представлен не только в эндосомах, как у большинства клеток, но и в небольшом количестве – на поверхности клетки (D. Lindau *et al.*, 2013).

Для того, чтобы проверить наше предположение, мы использовали ДНК-олигонуклеотид INH-18 (InvivoGen), который является антагонистом TLR9. Преинкубация с этим ингибирующим олигонуклеотидом перед добавлением мтДНК и GM-CSF практически полностью нивелировала их влияние на дегрануляцию нейтрофилов (Рис. 22).

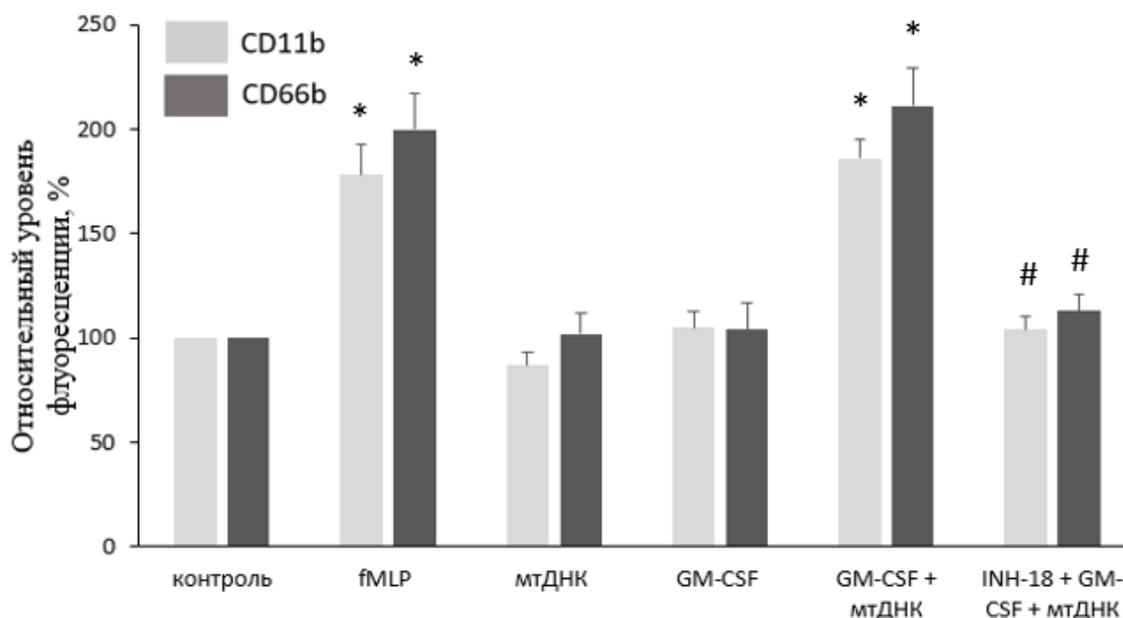


Рис. 22. МтДНК действует на активацию нейтрофилов через рецептор TLR9. Антагонист TLR9 (INH-18) уменьшает экспрессию молекул CD11b и CD66b на поверхности нейтрофилов в ответ на действие мтДНК (50 мкг/мл) и GM-CSF (2 нг/мл). Представлены данные проточной цитофлуориметрии. N=5; *p < 0.05 относительно контроля, #p < 0.05 относительно GM-CSF + мтДНК по критерию Манна –Уитни.

Таким образом, мы можем сказать, что активирующее действие мтДНК на праймированные нейтрофилы опосредовано взаимодействием с TLR9. В пользу релевантности нашей модели говорит тот факт, что под действием определённых активирующих стимулов количество представленных на поверхности нейтрофилов TLR9

может значительно увеличиваться (D. Lindau *et al.*, 2013). Мы предположили, что GM-CSF, оказывая праймирующее действие на нейтрофилы, увеличивает количество TLR9 на их поверхности. Данное предположение подкрепляется тем фактом, что инкубация нейтрофилов с GM-CSF увеличивает экспрессию TLR9 (Hayashi *et al.*, 2003). Возможно, что общее увеличение количества TLR9 приводит к повышению экспонирования его и на поверхности нейтрофилов, поэтому последующее взаимодействие этих рецепторов с мтДНК приводит к дегрануляции нейтрофилов и фосфорилированию p38, а в конечном итоге – к развитию воспаления.

Для того, чтобы проверить наше предположение, мы использовали антитела к TLR9, конъюгированные с флуоресцентным красителем фикоэритрином. Перед инкубацией с данными антителами пермеабиллизация нейтрофилов не проводилась, поэтому изменение интенсивности флуоресценции после праймирующего действия GM-CSF могло быть связано с молекулами TLR9 только на поверхности клеток, но не в мембранах эндосом.

Действительно, инкубация нейтрофилов в течение 20 минут с GM-CSF приводила к увеличению уровня флуоресценции, что указывает на увеличение количества TLR9 на поверхности клеток (Рис. 23).

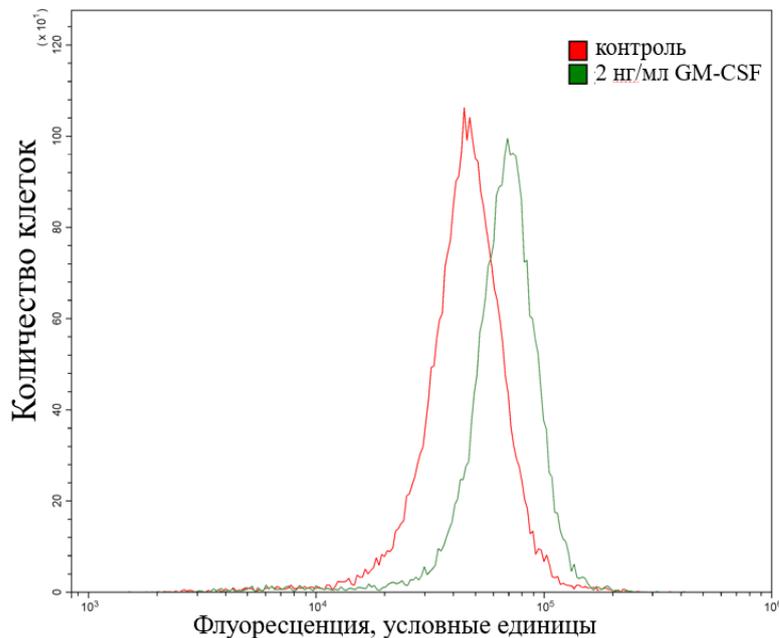


Рис. 23. GM-CSF увеличивает количество TLR9 на поверхности нейтрофилов. Нейтрофилы инкубировали в среде без активаторов (контроль) и в присутствии GM-CSF (2 нг/мл) в течение 20 минут.

Таким образом, мы прояснили механизм активации нейтрофилов мтДНК: интактные нейтрофилы имеют небольшое количество TLR9, поэтому мтДНК не вызывает их провоспалительной активации, однако праймирование GM-CSF увеличивает количество TLR9 как внутри эндосом, так и на поверхности, что приводит к связыванию мтДНК этим рецептором и последующей провоспалительной активации нейтрофилов.

Однако вопрос о вкладе мтДНК в общее провоспалительное действие митохондриальных образцов опасности остаётся открытым. Возможно, что мтДНК, высвобождающаяся из митохондрий при травме, практически не влияет на провоспалительную активацию нейтрофилов; однако не исключено также, что её вклад значителен. В пользу последнего соображения есть весомые доводы: количество мтДНК в крови пациентов с травмами коррелирует с тяжестью состояния и может служить прогностическим маркером выживаемости (Yamanouchi *et al.*, 2013).

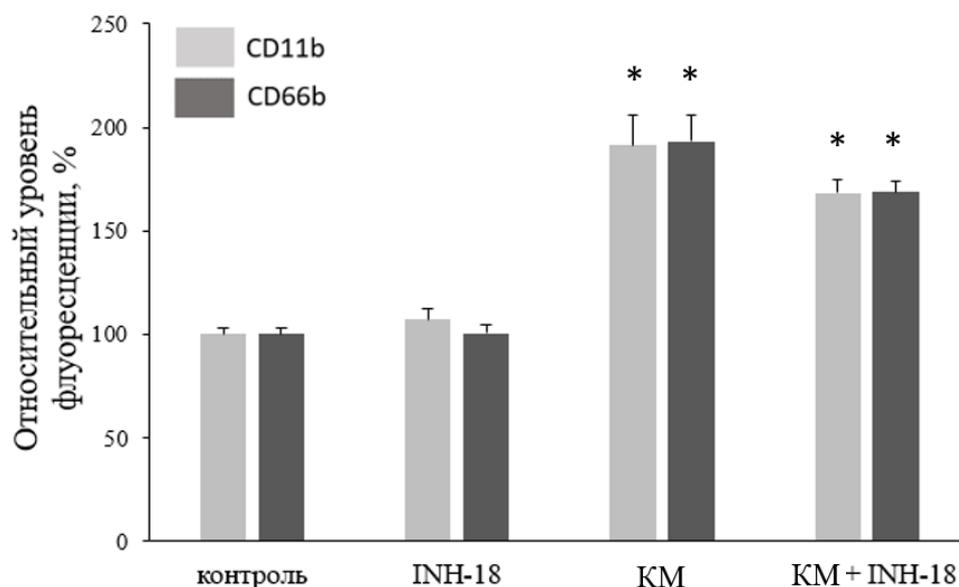


Рис. 24. МтДНК в составе КМ вносит вклад в активацию нейтрофилов. Антагонист TLR9 (INH-18) уменьшает экспрессию молекул CD11b и CD66b на поверхности нейтрофилов в ответ на действие КМ. Представлены данные проточной цитофлуориметрии. N=4; * $p < 0.05$.

Для того, чтобы оценить степень влияния мтДНК на воспалительный ответ нейтрофилов, мы использовали антагонист TLR9 (INH-18) и препараты КМ. Оказалось, что преинкубация с антагонистом TLR9 лишь в небольшой степени понижает экспрессию молекул CD11b и CD66b (Рис. 24). Если экстраполировать данные этого эксперимента на процессы, происходящие в организме, то можно сказать, что мтДНК в составе компонентов митохондрий, разрушаемых при травме, хотя и вносит свой вклад в активацию нейтрофилов и развитие воспаления, но этот вклад не является основным. При

этом необходимо отметить, что для точного ответа на этот вопрос требуются эксперименты *in vivo*.

4.1.5. Митохондриальная ДНК не увеличивает экспрессию молекул адгезии в эндотелиальных клетках

Образы опасности, вызывающие воспалительный ответ лейкоцитов, могут также активировать эндотелий, что приводит к увеличению его проницаемости. Одним из основных маркеров активации эндотелия являются молекулы клеточной адгезии (в том числе ICAM1), с которыми связываются лейкоциты, которые впоследствии мигрируют через эндотелиальный барьер в ткани. Мы предположили, что мтДНК может влиять не только на нейтрофилы, но и на эндотелиальные клетки, увеличивая таким образом воспалительный ответ.

Для экспериментов мы использовали линию эндотелиальных клеток человека EA.hy926 и следующие препараты ДНК: в качестве отрицательного контроля - плазмиду pAL-DNMT1, выделенную стандартным способом (с помощью набора для выделения ДНК производителя QIAGEN); ту же плазмиду, дополнительно очищенную от эндотоксинов на магнитных частицах; дополнительно очищенные препараты мтДНК и яДНК; и ЛПС в качестве положительного контроля. Эндотелиальные клетки инкубировали с данными препаратами в течение 6 часов, а затем анализировали уровень экспрессии мРНК ICAM1 с помощью ПЦР в реальном времени.

Результаты этих экспериментов хорошо соотносятся с данными, полученными на нейтрофилах (ср. рис. 25 и рис. 16-18). Во-первых, ответ клеток зависит от степени очистки препарата ДНК: дополнительно очищенная плазмида в значительно меньшей степени индуцировала синтез мРНК ICAM1, чем плазмида стандартной очистки. Во-вторых, чистые препараты мтДНК и яДНК не вызывали активацию эндотелия, как и в случае с нейтрофилами; более того – они даже в небольшой степени ингибировали экспрессию мРНК ICAM1 (Рис. 25).

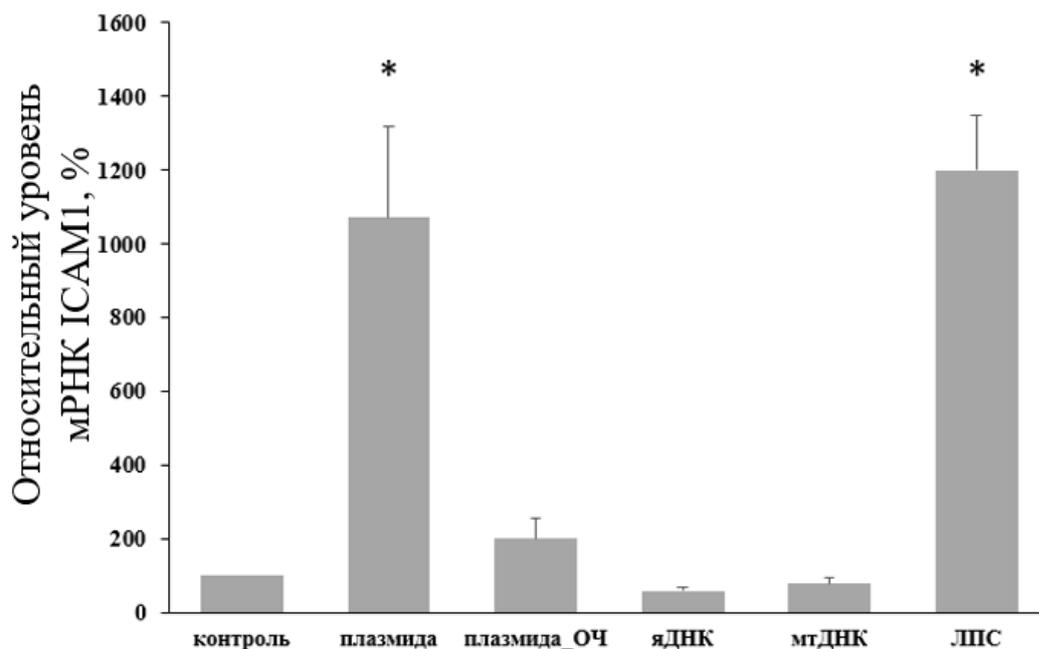


Рис. 25. Действие ДНК на активацию клеток эндотелия человека. Клетки инкубировали в течение 6 часов со следующими индукторами: плазмида (10 мкг/мл); плазмида, дополнительно очищенная от эндотоксинов (плазмида_ОЧ, 10 мкг/мл); ядерная ДНК (ядНК, 10 мкг/мл); митохондриальная ДНК (мтДНК, 10 мкг/мл). В качестве положительного контроля использовали липополисахарид (ЛПС, 100 нг/мл). Относительный уровень мРНК ICAM1 изображён на оси ординат, за 100% принято значение в контрольных клетках. Представлены данные ПЦР в реальном времени. N=5; * p<0.01.

Мы предположили, что, как и в случае нейтрофилов, мтДНК активирует клетки через TLR9. Однако, этот рецептор в эндотелиальных клетках расположен исключительно в эндосомах, а не на плазматической мембране. Поэтому мы решили провести трансфекцию наших препаратов мтДНК с липофектаминол. По результатам наших экспериментов оказалось, что при трансфекции мтДНК в клетки относительный уровень мРНК ICAM1 увеличивается более, чем в 10 раз (Рис. 26).

Активация внутриклеточных рецепторов предполагает стадию закисления эндосом и последующее их созревание. Этот процесс может быть ингибирован хлорокином, активность которого направлена именно на изменение эндосомального pH. В своих экспериментах мы инкубировали клетки эндотелия EA.hy926 с хлорокином в течение 30 минут, после чего проводили трансфекцию препаратов ДНК липофектаминол. Как и предполагалось, хлорокин значительно понизил эффект митохондриальной ДНК на эндотелий (Рис. 26), что указывает на участие эндосом в активации эндотелия в ответ на мтДНК.

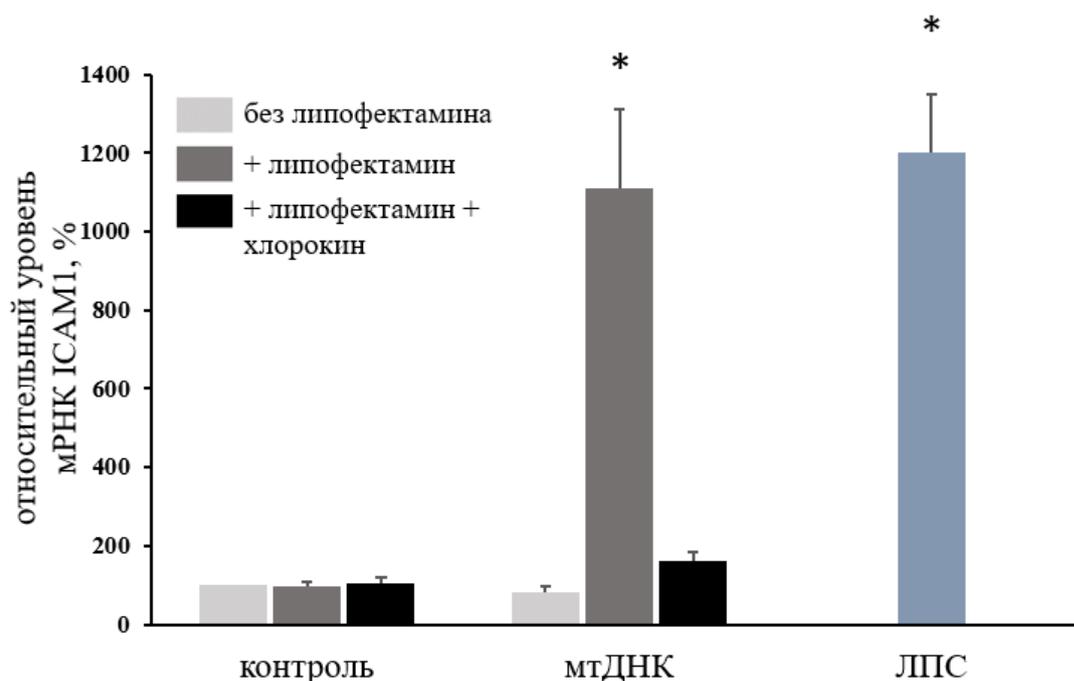


Рис. 26. мтДНК активирует клетки эндотелия человека при попадании в эндосомы. Клетки инкубировали в течение 6 часов с мтДНК (10 мкг/мл). Проводили трансфекцию этих же препаратов ДНК липофектаминами в клетки эндотелия в течение 6 часов. Проводили преинкубацию с хлорокином (5 мкМ), после чего и трансфецировали препаратами ДНК (10 мкг/мл). В качестве положительного контроля использовали липополисахарид (ЛПС) в концентрации 100 нг/мл. Относительный уровень мРНК ICAM1 представлен на оси ординат. N=5; * $p < 0.01$.

4.1.6. Подведение итогов главы 4.1

Резюмируя полученные результаты, мы можем утверждать, что чистая мтДНК не способна самостоятельно проникать в клетки эндотелия и вызывать их активацию.

Несмотря на то, что данные, полученные на эндотелиальных клетках, подтверждают данные, полученные на нейтрофилах, они противоречат некоторым результатам, полученным проф. Хаузером в экспериментах на эндотелии. Так, этой группой исследователей было показано, что не только компоненты митохондрий, но и митохондриальная ДНК способны увеличивать экспрессию ICAM1 и проницаемость эндотелия (Sun *et al.*, 2013). Интересно, что хлорокин, ингибитор созревания эндосом, ингибировал увеличение проницаемости эндотелия под действием КМ и мтДНК, что полностью согласуется с нашими данными. Более того, Хаузер и соавторы с помощью флуоресцентной микроскопии показали, что мтДНК действительно находится в эндосомах эндотелия (Sun *et al.*, 2013). Однако неясно, как же мтДНК попадает внутрь

эндотелиальных клеток. Возможно, препараты мтДНК, недостаточно очищенные проф. Хаузером и его коллегами, содержат некие примеси, помогающие ДНК преодолеть цитоплазматическую мембрану клетки и попасть в эндосомы.

Суммируя данные, полученные на нейтрофилах человека и на эндотелиальных клетках линии EA.hy926, можно утверждать, что мтДНК вносит определённый вклад в провоспалительную активацию нейтрофилов и развитие воспалительного ответа. Однако стоит отметить несостоятельность гипотезы проф. Хаузера о том, что мтДНК, попадающая в кровотоки в результате разрушения клеток при травме, является основным индуктором воспалительного ответа. По нашим данным, очищенная мтДНК не вызывает провоспалительной активации нейтрофилов и эндотелия – в отличие от компонентов митохондрий, содержащих множество других молекул. Для активации нейтрофилов под действием мтДНК требуется праймирование или предварительная активация какими-либо другими факторами. Кроме того, яДНК обладает схожим, хотя и менее выраженным действием: в отсутствие примесей она не способна активировать нейтрофилы, но предварительное праймирование клеток вызывает провоспалительный ответ. Из этого можно заключить, что ни ядерная, ни митохондриальная ДНК сами по себе не являются индукторами воспалительного ответа, но в присутствии дополнительных факторов вносят определённый (но не основной) вклад в развитие воспаления.

Если экстраполировать полученные *in vitro* данные на воспалительные реакции, происходящие в организме человека при травмах, то можно сделать следующие выводы: при разрушении клеток в результате травмы в кровоток попадает внутреннее содержимое митохондрий, в том числе мтДНК, и это приводит к развитию воспалительного ответа. Какие из компонентов митохондрий играют важнейшую роль в этом процессе, ещё предстоит установить, но мы показали, что это не мтДНК, как предполагалось ранее некоторыми исследователями. Более того – возможно, что за развитие воспалительного ответа в большей мере ответственны другие структуры клетки, а вовсе не митохондрии. Однако не стоит недооценивать роль мтДНК в медицине: по различным исследованиям, концентрация мтДНК в плазме пациентов может служить надёжным прогностическим маркером выживаемости – и это несмотря на то, что абсолютное её количество невелико (по разным данным, не более нескольких нанограмм на мл) и в тысячи раз меньше содержания яДНК в крови (Lam *et al.*, 2004; Prikhodko *et al.*, 2015).

4.2. Митохондриальные активные формы кислорода в жизнедеятельности нейтрофилов

4.2.1. Митохондриально-направленные антиоксиданты семейства SkQ специфично накапливаются в митохондриях нейтрофилов человека

Хорошо известно, что в нейтрофилах активными формами кислорода прямо или косвенно регулируются многие процессы: апоптоз, образование внеклеточных ловушек – нетоз, хемотаксис и другие (Winterbourn, Kettle, & Hampton, 2016). Установлено, что АФК, в большом количестве производимые НАДФН-оксидазой активированных нейтрофилов, в значительной степени влияют на данные процессы, но роль остальных АФК, в частности, митохондриальных, остаётся малоизученной (Dan Dunn, Alvarez, Zhang, & Soldati, 2015).

Особенно интересным остаётся вопрос о вкладе АФК, продуцируемых митохондриями, в процессы активации и апоптоза нейтрофилов. Как уже упоминалось выше, митохондрий в нейтрофилах немного и они не синтезируют АТФ для энергетических нужд клетки, но участвуют в апоптозе и, вероятно, во многих других процессах. Мы решили изучить вклад митохондриальных АФК в процессы активации и апоптоза нейтрофилов. Для этого мы использовали митохондриально-направленные антиоксиданты (SkQ1 и MitoTEMPO), классические антиоксиданты (Trolox, N-ацетилцистеин) и разобщители дыхания и окислительного фосфорилирования (ДНФ, FCCP, C_{12} TPP).

Антиоксиданты семейства SkQ обладают способностью специфично накапливаться в митохондриях за счёт трансмембранного потенциала в этих органеллах, что было продемонстрировано на множестве линий клеток млекопитающих (Antonenko *et al.*, 2008). Тем не менее, в нейтрофилах митохондриальная направленность данных антиоксидантов была под вопросом в связи с особенностью митохондрий данных клеток (малое число, низкая метаболическая активность). Для подтверждения митохондриальной направленности антиоксидантов семейства SkQ мы использовали флуоресцентный аналог SkQ1 на основе родамина – SkQR1 (флуоресценция в красной области спектра) и митохондриально-направленный краситель MitoTracker Green (зелёная флуоресценция). В покоящихся нейтрофилах мы наблюдали колокализацию этих флуоресцентных соединений, которые окрашивали хорошо заметные тубулярные митохондрии (Рис. 27А). Такие же митохондрии в нейтрофилах человека были описаны ранее в работе Fossati с соавторами с использованием митохондриального флуоресцентного красителя MitoTracker Red (Fossati *et al.*, 2003). Таким образом, впервые было показано, что

митохондриально-направленные антиоксиданты семейства SkQ специфично накапливаются в митохондриях покоящихся нейтрофилов человека.

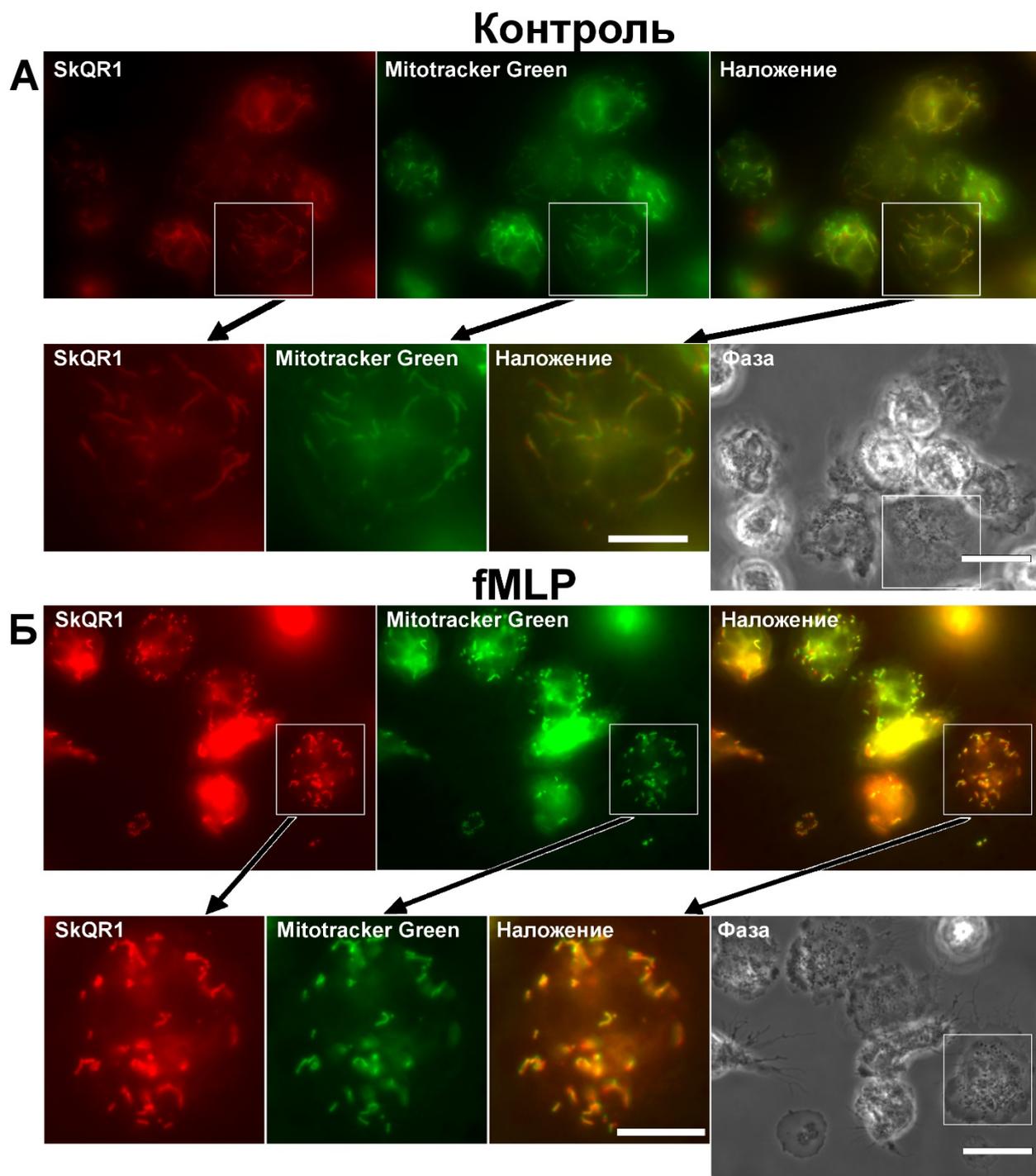


Рис. 27. Митохондриальная локализация SkQR1 в интактных (А) и fMLP-стимулированных (Б) нейтрофилах. А: Суспензию нейтрофилов инкубировали с 20 нМ SkQR1 в течение 30 мин, затем добавляли MitoTracker Green (200 нМ) на 30 мин, после чего нейтрофилы осаждали центрифугированием, ресуспендировали в среде и помещали на чашки. Б: нейтрофилы стимулировали 200 нМ fMLP в течение 30 мин после загрузки SkQR1 и MitoTracker Green, как описано в (А). Масштабная линейка – 5 мкм (слева) и 10 мкм (справа).

Однако оставалась возможность, что SkQ1 может также оказаться во вторичных специфичных гранулах при активации нейтрофилов. Ранее, в работе Karlsson и Dahlgren было показано, что при сборке и активации НАДФН-оксидазы во вторичных гранулах, возможно, образуется трансмембранный электрический потенциал с отрицательным зарядом внутри гранул (Karlsson & Dahlgren, 2002). В этом случае положительно заряженные катионы трифенилфосфония, которые содержит SkQ1, могут оказаться внутри этих гранул и повлиять на развитие окислительного стресса. С целью изучения этого вопроса мы инкубировали нейтрофилы с MitoTracker Green и SkQR1, после чего активировали их с помощью трипептида fMLP. Мы показали, что подавляющее количество SkQR1 локализуется в митохондриях (Рис. 27Б). Таким образом, при активации нейтрофилов не происходит изменения внутриклеточной локализации митохондриально-направленных антиоксидантов семейства SkQ. При проведении данного опыта мы также заметили, что активация нейтрофилов с помощью fMLP приводила к фрагментации тубулярных митохондрий (Рис. 27Б). Возможно, этот эффект обусловлен повышением концентрации ионов кальция внутри клеток, за которым следует деполяризация и дробление митохондрий, однако данный вопрос требует дальнейшего исследования.

4.2.2. Снижение уровня мтАФК уменьшает общее количество АФК активированных нейтрофилов человека

На следующем этапе нашей работы мы решили изучить действие митохондриально-направленных антиоксидантов на общее количество АФК, продуцируемых как покоящимися нейтрофилами, так и активированными. Известно, что различные образы опасности, распознаваемые рецепторами нейтрофилов, провоцируют образование АФК или даже окислительный взрыв (Asehnoune *et al.*, 2004). Одним из таких веществ является липополисахарид (ЛПС), компонент клеточной стенки бактерий; его мы использовали в нашем исследовании. Для оценки общего количества АФК мы использовали краситель DCF (диацетат 2,7-дихлордигидрофлуоресцеина), флуоресценция которого увеличивается при повышении концентрации АФК в клетке. В качестве контроля мы добавляли классические антиоксиданты (Trolox), а также митохондриально-направленное производное SkQ1, не имеющее антиоксидантной активности (C₁₂TRP).

Из рис. 28 видно, что на базовую продукцию АФК покоящимися нейтрофилами ни разобщители, ни антиоксиданты (как классические, так и митохондриально-адресованные) существенно не влияли. Активация ЛПС приводила к резкому увеличению количества внутриклеточных АФК у нейтрофилов, и оба типа антиоксидантов

значительно понижали общий уровень АФК, чего не наблюдалось в случае разобщителя окислительного фосфорилирования $C_{12}TPP$. Митохондриально-направленный прооксидант SkQN значительно увеличивал продукцию АФК интактными нейтрофилами и не оказывал влияния на ЛПС-активированные клетки.

Из этих данных мы можем сделать вывод, что блокирование митохондриальных АФК не приводит к выраженному изменению общего количества АФК у покоящихся нейтрофилов, но снижает уровень АФК, продуцируемых в ответ на провоспалительный фактор (ЛПС). В то же время увеличение мтАФК с помощью митохондриально-адресованного прооксиданта значительно увеличивает количество общих АФК как у интактных нейтрофилов, так и ЛПС-активированных.

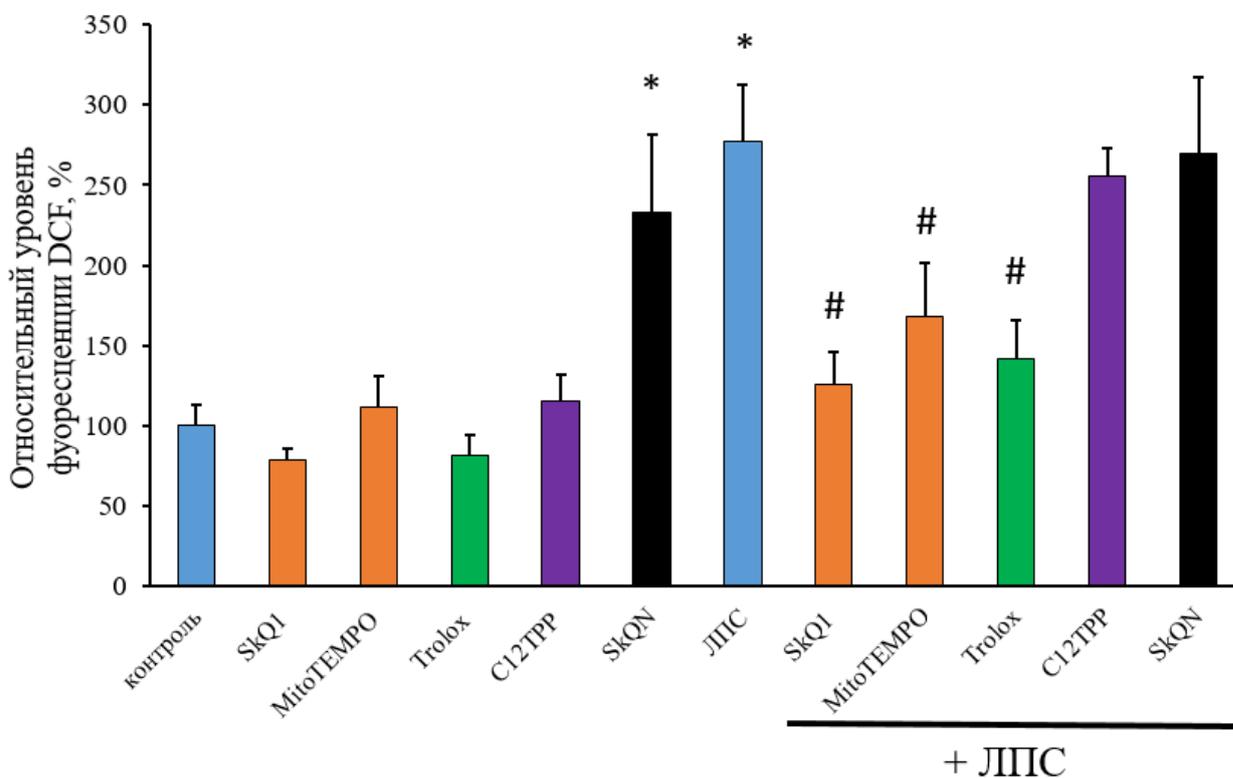


Рис. 28. Влияние анти-, прооксидантов и разобщителей на продукцию АФК интактными и ЛПС-активированными нейтрофилами. Нейтрофилы культивировались в среде с митохондриально-направленными антиоксидантами (400 нМ SkQ1, 10 мкМ MitoTEMPO – здесь и далее выделены оранжевым цветом), прооксидантом (400 нМ SkQN – выделен чёрным), классическим антиоксидантом (100 мкМ Trolox – выделен зелёным) или разобщителем (400 нМ $C_{12}TPP$ – выделен фиолетовым) в течение 1 часа, а затем стимулировали ЛПС (100 нг/мл) на 30 мин, после чего клетки анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии по флуоресценции DCF. N=7, *p < 0.01 (относительно контроля), #p < 0.01 относительно ЛПС.

4.2.3. Снижение уровня мТАФК уменьшает активацию нейтрофилов

Продукция нейтрофилами АФК в ответ на сигналы эндогенной опасности или патогены обычно сопровождается морфологическими изменениями в нейтрофилах для обеспечения хемотаксиса и трансэндотелиальной миграции: клетки теряют сферическую форму, распластываются на субстрате, становятся фибробластоподобными. Мы оценили морфологические изменения нейтрофилов и их митохондрий под действием провоспалительного фактора ЛПС, а также влияние мТАФК на данные изменения.

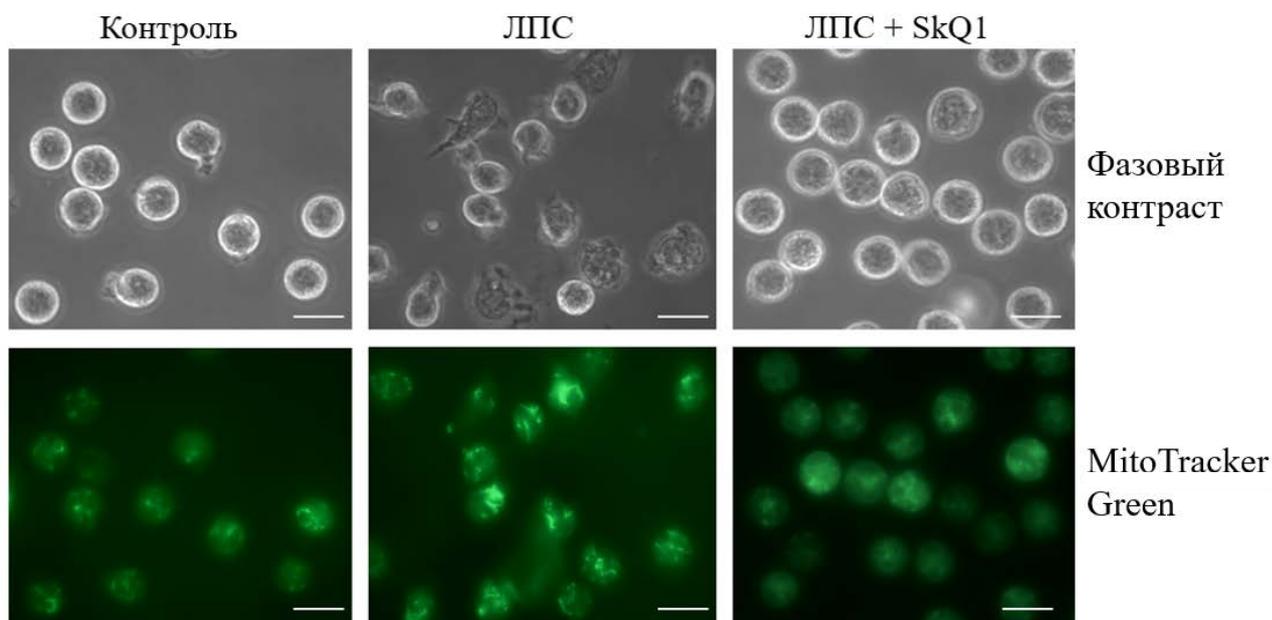


Рис. 29. Влияние митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 на морфологию ЛПС-активированных нейтрофилов. Нейтрофилы культивировали в среде с SkQ1 (400 нМ) в течение 1 часа, затем добавляли ЛПС (100 нг/мл) и краситель MitoTracker Green на 30 мин, после чего клетки анализировали с помощью флуоресцентной микроскопии.

Как видно из рис. 29, под действием ЛПС нейтрофилы заметно уплощаются и вытягиваются, явно выражена их адгезия к субстрату. Похоже, что некоторые клетки увеличиваются в размере и “пенятся”, что указывает на их возможную дегрануляцию. Добавление митохондриально-адресованного антиоксиданта SkQ1 к ЛПС-активированным нейтрофилам практически полностью нивелирует наблюдаемые эффекты. Кроме того, фрагментация митохондрий, наблюдаемая в нейтрофилах под действием ЛПС, также в значительной мере предотвращалась митохондриально-направленным антиоксидантом. Таким образом, можно сказать, что снижение уровня мТАФК предотвращает появление провоспалительных морфологических изменений под действием ЛПС.

Однако эти данные указывают на качественные изменения и влияние мтАФК на них, количественно оценить их достаточно сложно и трудоёмко. Поэтому для количественной оценки дегрануляции (секреторной активности) нейтрофилов и влияния мтАФК на этот процесс мы использовали уже упоминавшийся маркер дегрануляции CD66b.

Для активации нейтрофилов мы добавляли fMLP, а не ЛПС, как в предыдущем опыте, поскольку в наших экспериментах данный трипептид вызывал дегрануляцию нейтрофилов быстрее, чем ЛПС. Преинкубация с митохондриально-направленным антиоксидантом SkQ1 в концентрациях 200 нМ и выше значительно понижала активационный эффект fMLP, в то время как разобщитель окислительного фосфорилирования такого влияния не оказывал (Рис. 30).

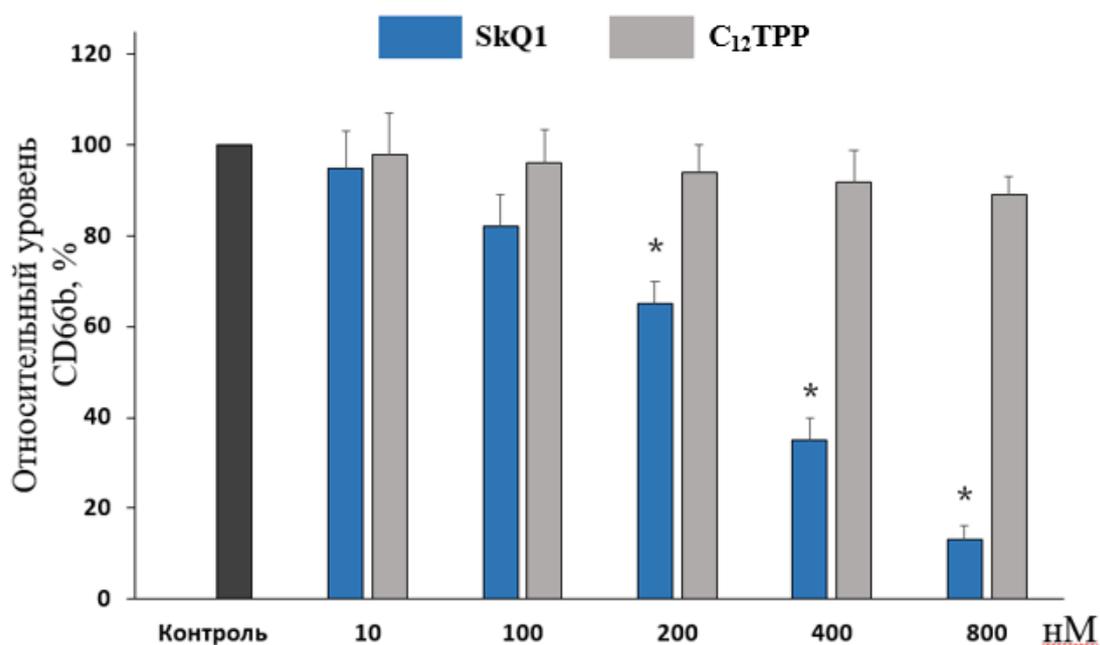


Рис. 30. Действие митохондриальных АФК на экспонирование молекул CD66b в нейтрофилах человека. Нейтрофилы инкубировали в среде со 100 нМ fMLP (контроль), а также с митохондриально-направленным антиоксидантом SkQ1 или разобщителем окислительного фосфорилирования C₁₂TPP. N=6; * p < 0.01 по критерию Манна –Уитни.

Таким образом, мы можем заключить, что снижение уровня митохондриальных АФК приводит к уменьшению дегрануляции (провоспалительной активации) нейтрофилов. Эти данные согласуются с исследованиями других групп, изучавших влияние MitoTEMPO на нетоз нейтрофилов, который так же, как и дегрануляция, происходит в ответ на взаимодействие с образцами опасности или патогенами. Так, было показано, что снижение уровня митохондриальных АФК уменьшает количество внеклеточных ловушек

нейтрофилов (Lood *et al.*, 2016). Такой же эффект наблюдается и в случае классических антиоксидантов: добавление N-ацетилцистеина или Trolox перед инкубацией с ЛПС значительно снижает активацию MAP-киназного каскада и уменьшает секрецию цитокинов (Asehnoune *et al.*, 2004). Можем сделать вывод, что митохондриальные АФК – так же, как и остальные виды АФК – вносят вклад в активацию нейтрофилов, а их ингибирование уменьшает провоспалительную активацию нейтрофилов.

4.2.4. Снижение уровня мтАФК увеличивает уровень апоптоза нейтрофилов человека

В норме при отсутствии воспалительных сигналов жизненный цикл нейтрофилов оканчивается спонтанным апоптозом. Если нейтрофилы по каким-то причинам не умирают или подвергаются другому виду клеточной смерти (некроз, пироптоз, нетоз), то это провоцирует усиление воспалительного ответа организма. Мы исследовали вклад митохондриальных АФК в процесс спонтанной гибели нейтрофилов.

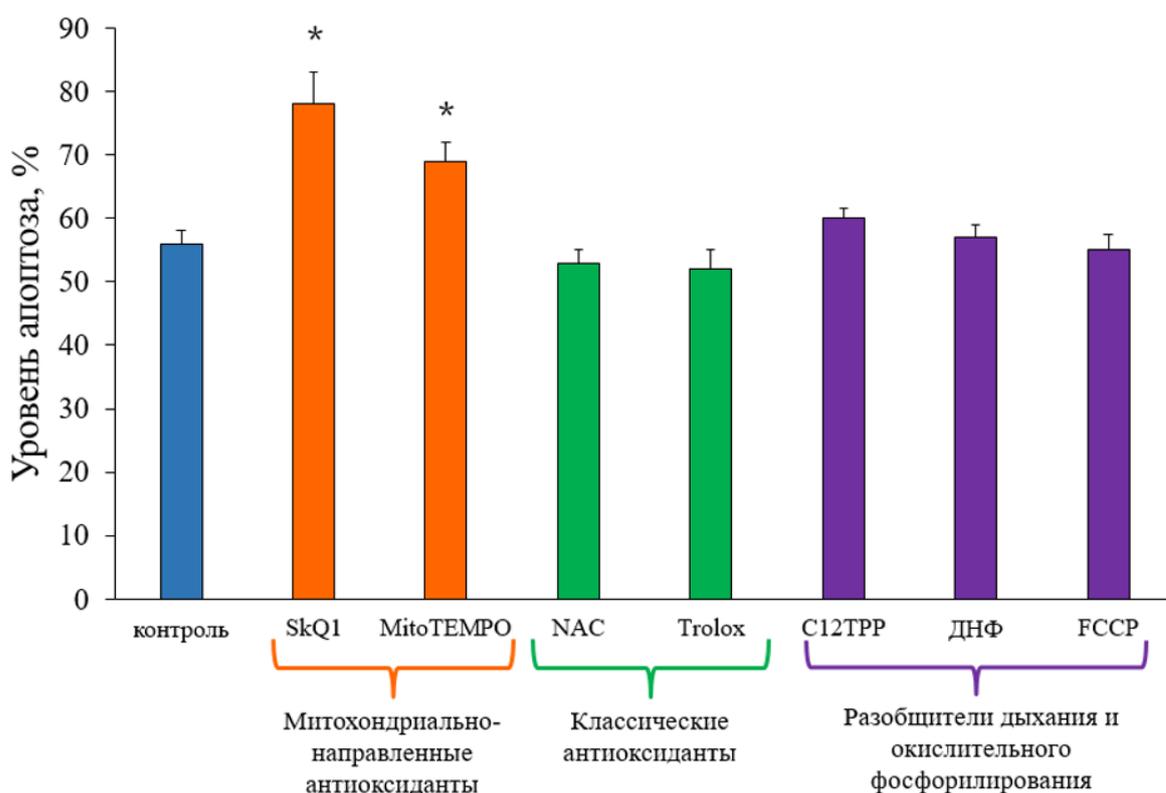


Рис. 31. Влияние антиоксидантов и разобщителей окислительного фосфорилирования на спонтанный апоптоз нейтрофилов. Нейтрофилы инкубировали с митохондриально-направленными антиоксидантами (400 нМ SkQ1 или 20 мкМ MitoTEMPO), классическими антиоксидантами (0,5 мМ NAC или 100 мкМ Trolox) и разобщителями (400 нМ C₁₂TPP, 5 мкМ ДНФ или 20 нМ FCCP) в течение 22 часов. Уровень апоптоза измеряли окрашиванием аннексином

V и иодидом пропидия. Апоптотическими клетками считали аннексин-положительные и пропидий иодид-отрицательные клетки. N=5; * $p < 0.05$ по критерию Манна –Уитни.

Оказалось, что митохондриально-направленный антиоксидант (SkQ1) значительно увеличивает уровень спонтанного апоптоза нейтрофилов, в то время как классические антиоксиданты и разобщители практически не влияли на спонтанный апоптоз (Рис. 31). Иначе говоря, уменьшение митохондриальных АФК увеличивает уровень апоптоза нейтрофилов, а падение митохондриального потенциала и уменьшение общего уровня АФК такого эффекта не оказывают. Эти данные противоречат тому, что известно для влияния общих АФК на апоптоз нейтрофилов: классические антиоксиданты либо не влияют на апоптоз нейтрофилов, либо откладывают его (Melley, Evans, & Quinlan, 2005).

Для того, чтобы убедиться, что уменьшение митохондриальных АФК увеличивает уровень именно апоптоза, а не другого вида клеточной смерти (пироптоз, некроз), мы решили изучить активность каспазы-3, основной эффекторной каспазы, участвующей в запуске апоптоза, а также фрагментацию ядра, которая наблюдается на поздних стадиях апоптоза.

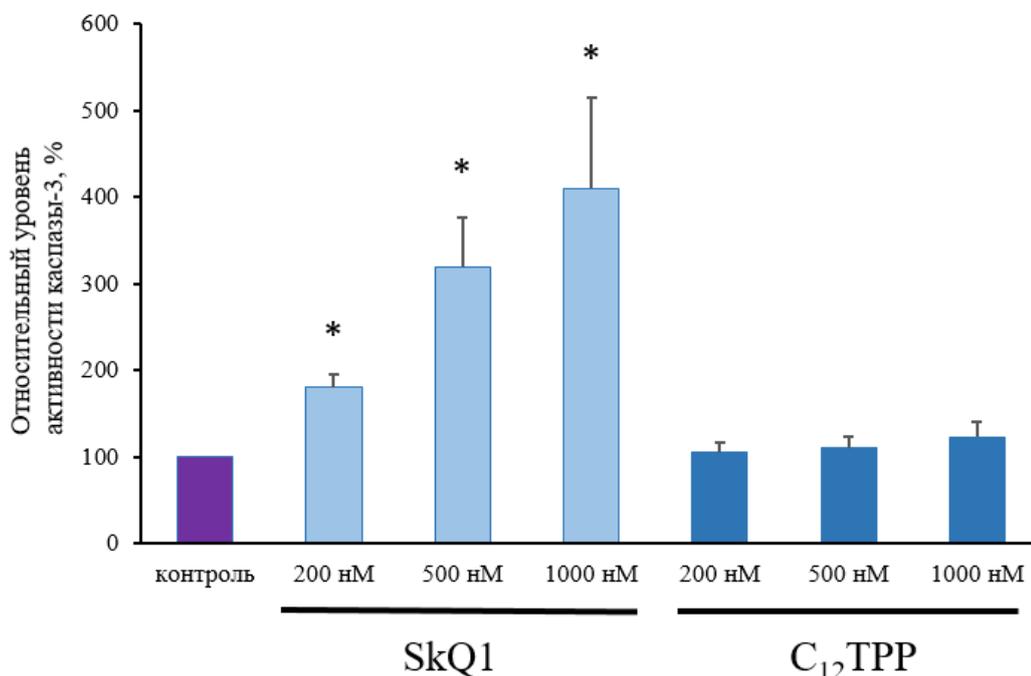


Рис. 32. Уменьшение количества митохондриальных АФК приводит к увеличению активности каспазы-3 в нейтрофилах человека. Митохондриально-направленный антиоксидант SkQ1, но не разобщитель C₁₂TPP, приводит к увеличению активности каспазы-3 через 6 часов инкубации. Активность каспазы-3 в контроле была принята за 100%. N=6; * $p < 0.01$ по критерию Манна –Уитни.

Уменьшение количества митохондриальных АФК с помощью митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 приводило к увеличению активности каспазы-3, причём с увеличением концентрации росла и активность каспазы, в то время как разобщитель окислительного фосфорилирования ($C_{12}TPP$) не оказывал существенного влияния на этот параметр (Рис. 32).

Также факт апоптоза нейтрофилов был дополнительно подтверждён флуоресцентной микроскопией с использованием красителя Hoechst, который связывается с ДНК. В контроле были хорошо видны типичные сегментированные ядра нейтрофилов, количество круглых клеток с конденсированным хроматином было мало (Рис. 33). Митохондриально-направленный антиоксидант SkQ1 в концентрации 400 нМ значительно увеличивал количество клеток с плотно упакованным хроматином, что наблюдается при апоптозе (Рис. 33).

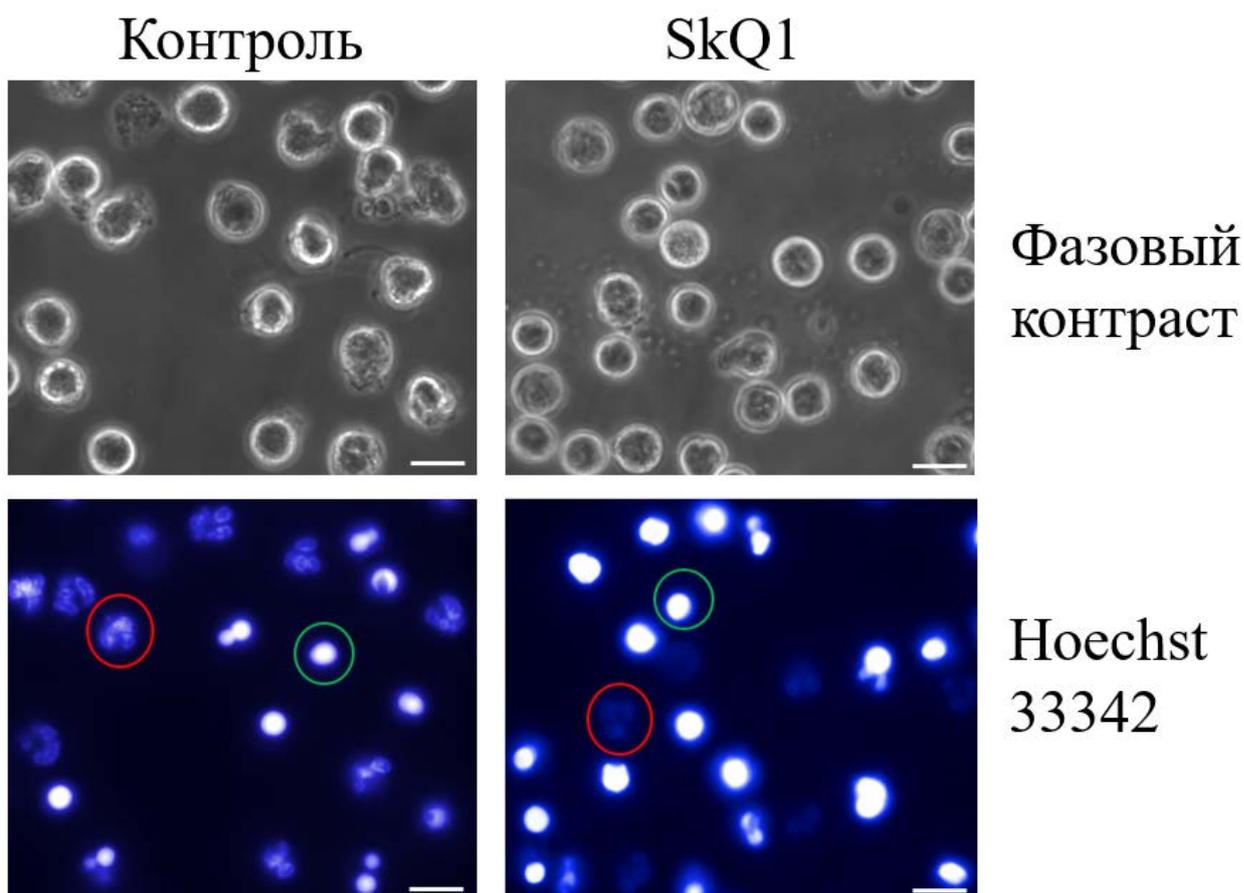


Рис. 33. Уменьшение количества мтАФК увеличивает уровень апоптоза нейтрофилов.

Инкубация с 400 нМ SkQ1 в течение 22 часов увеличивает количество апоптотических клеток. Красным обведены типичные сегментированные ядра живых нейтрофилов, зелёным – клетки с конденсированным хроматином. Масштабная линейка – 10 мкм.

Таким образом, мы показали, что митохондриальные АФК влияют именно на апоптоз нейтрофилов, а не на другие виды клеточной смерти.

Поскольку известно, что под действием индукторов воспаления выживаемость нейтрофилов увеличивается, мы решили исследовать, как снижение уровня митохондриальных АФК повлияет на апоптоз нейтрофилов после их активации. Для активации нейтрофилов мы использовали ЛПС.

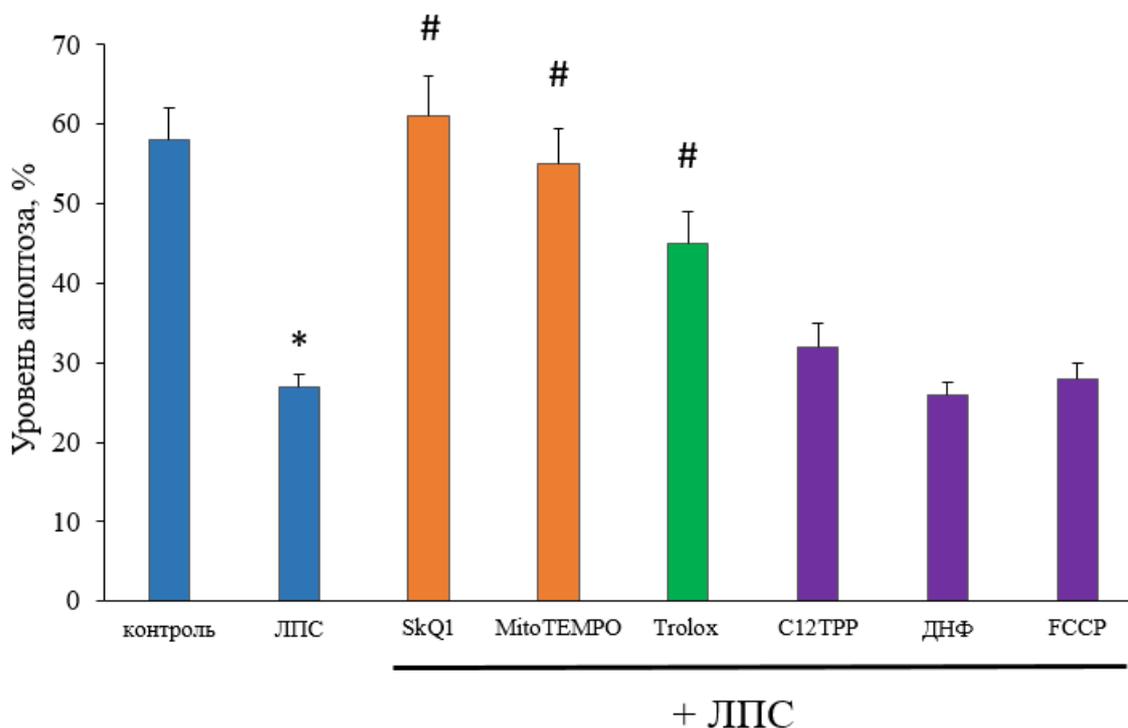


Рис. 34. Влияние антиоксидантов и разобщителей на ЛПС-индуцируемую выживаемость нейтрофилов. Условия эксперимента такие же, как описано для Рис. 30. N=6; * $p < 0.01$ (относительно контроля), # $p < 0.05$ (относительно ЛПС) по критерию Манна –Уитни.

В наших экспериментах ЛПС уменьшал уровень апоптоза, поскольку является мощным провоспалительным фактором (Рис. 34). Митохондриально-направленный антиоксидант SkQ1 отменял действие ЛПС, увеличивая уровень апоптоза до контрольного, классический антиоксидант Trolox обладал тем же эффектом, но он был менее выражен, несмотря на то, что его концентрация была значительно выше, чем концентрация SkQ1 (Рис. 34). Разобщители окислительного фосфорилирования никак не влияли на ЛПС-индуцируемую выживаемость нейтрофилов. Как в случае спонтанного апоптоза, при добавлении ЛПС уменьшение количества митохондриальных АФК увеличивало уровень апоптоза нейтрофилов. Интересно отметить, что на спонтанный апоптоз влияли только митохондриально-направленные антиоксиданты, но не классические. В противовес этому,

на фоне ЛПС апоптоз снижался как при добавлении митохондриально-направленных антиоксидантов, так и классических.

Полученные нами данные о влиянии различных веществ укладываются в общепринятую парадигму влияния АФК на активацию нейтрофилов. Известно, что активация нейтрофилов под действием провоспалительных агентов, например, ЛПС сопровождается увеличением продукции АФК (Asehnoune *et al.*, 2004). Поэтому логично, что при добавлении классических антиоксидантов на фоне ЛПС происходит снижение уровня АФК и, как следствие, снижение активации и увеличение уровня апоптоза. Схожим эффектом обладают и митохондриально-направленные антиоксиданты, что, по всей видимости, отражает связь между мтАФК и общими внутриклеточными АФК в нейтрофилах. Отсутствие влияния классических антиоксидантов на спонтанный апоптоз нейтрофилов может объясняться тем фактом, что интактные нейтрофилы производят незначительное количество АФК, изменение количества которых для клетки не играет важной роли. Возможно, что митохондриально-направленные антиоксиданты в гораздо большей мере влияют на продукцию внутриклеточных АФК покоящимися нейтрофилами, что сказывается на спонтанном апоптозе. Тем не менее, мы не обнаружили достоверного снижения общего количества АФК под действием митохондриально-адресованных антиоксидантов по сравнению с классическими. Учитывая все эти факты, логично заключить, что мтАФК влияют на спонтанный апоптоз какими-то иными путями нежели уменьшение общего количества АФК, но этот вопрос требует дальнейшего изучения.

4.2.5. Снижение уровня мтАФК связано с уменьшением фосфорилирования MAP-киназ p38 и ERK1/2

Как уже упоминалось выше, одним из основных каскадов активации в нейтрофилах является MAP-киназный каскад. Мы предположили, что механизм действия митохондриальных АФК может быть связан с этим каскадом, а именно с киназой p38.

В наших экспериментах митохондриально-направленный и классический антиоксиданты, а также разобщитель не влияли на фосфорилирование p38 в нейтрофилах, не подвергавшихся воздействию провоспалительных факторов (Рис. 35). Однако митохондриально-направленный антиоксидант значительно понижал уровень фосфорилирования p38 в нейтрофилах, инкубированных с ЛПС (Рис. 35), что согласуется с экспериментами по апоптозу и активации нейтрофилов. Классический антиоксидант Trolox продемонстрировал схожий, но менее выраженный эффект, в то время как

разобшитель не оказывал значительного влияния на фосфорилирование p38 под действием ЛПС.

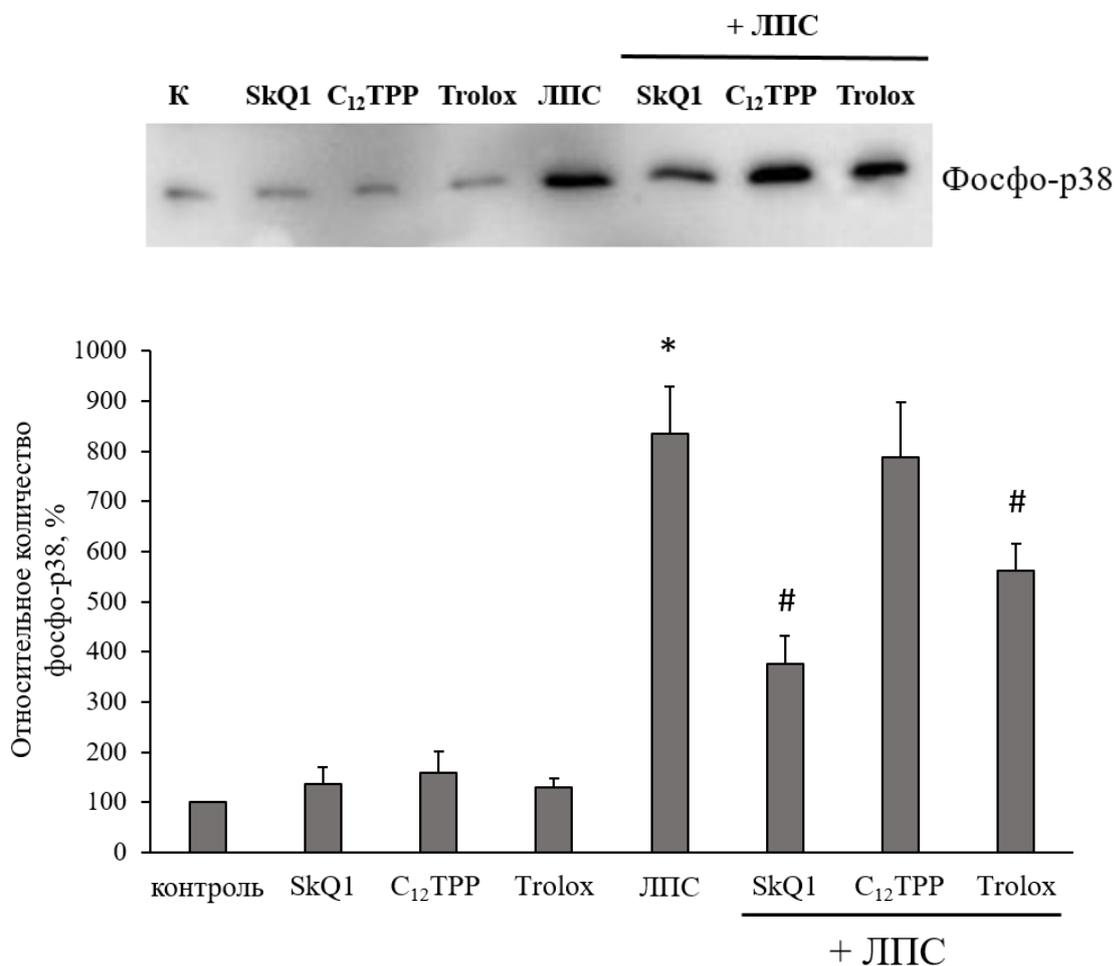


Рис. 35. Влияние митохондриальных и цитоплазматических АФК на уровень фосфорилирования MAP-киназы p38 под действием ЛПС в нейтрофилах человека.

Нейтрофилы инкубировали с митохондриально-направленным антиоксидантом (400 нМ SkQ1), разобшителем окислительного фосфорилирования (400 нМ C₁₂TPP) и классическим антиоксидантом (100 мкМ Trolox). Представлен репрезентативный вестерн-блот и денситометрический анализ данных. N=5; * p < 0.01 (относительно контроля), # p < 0.01 относительно ЛПС.

Схожие эффекты были получены для другой MAP-киназы – ERK1/2 (Рис. 36). Так же, как и в случае с киназой p38, добавление митохондриально-направленных и классического антиоксидантов, а также разобшителя не влияло на базовый уровень фосфорилирования ERK1/2. Однако в ЛПС-активированных нейтрофилах уровень фосфорилирования ERK1/2 значительно повышался, а митохондриально-направленные антиоксиданты снижали фосфорилирование. Интересно отметить, что влияние классического антиоксиданта

Trolox на фосфорилирование ERK1/2 в активированных нейтрофилах было более заметным, чем в случае с киназой p38, и сопоставимо с эффектом митохондриально-направленных антиоксидантов. Митохондриально-адресованный разобщитель C₁₂TRP тоже понижал уровень фосфорилирования киназы ERK1/2 в нейтрофилах, инкубированных с ЛПС.

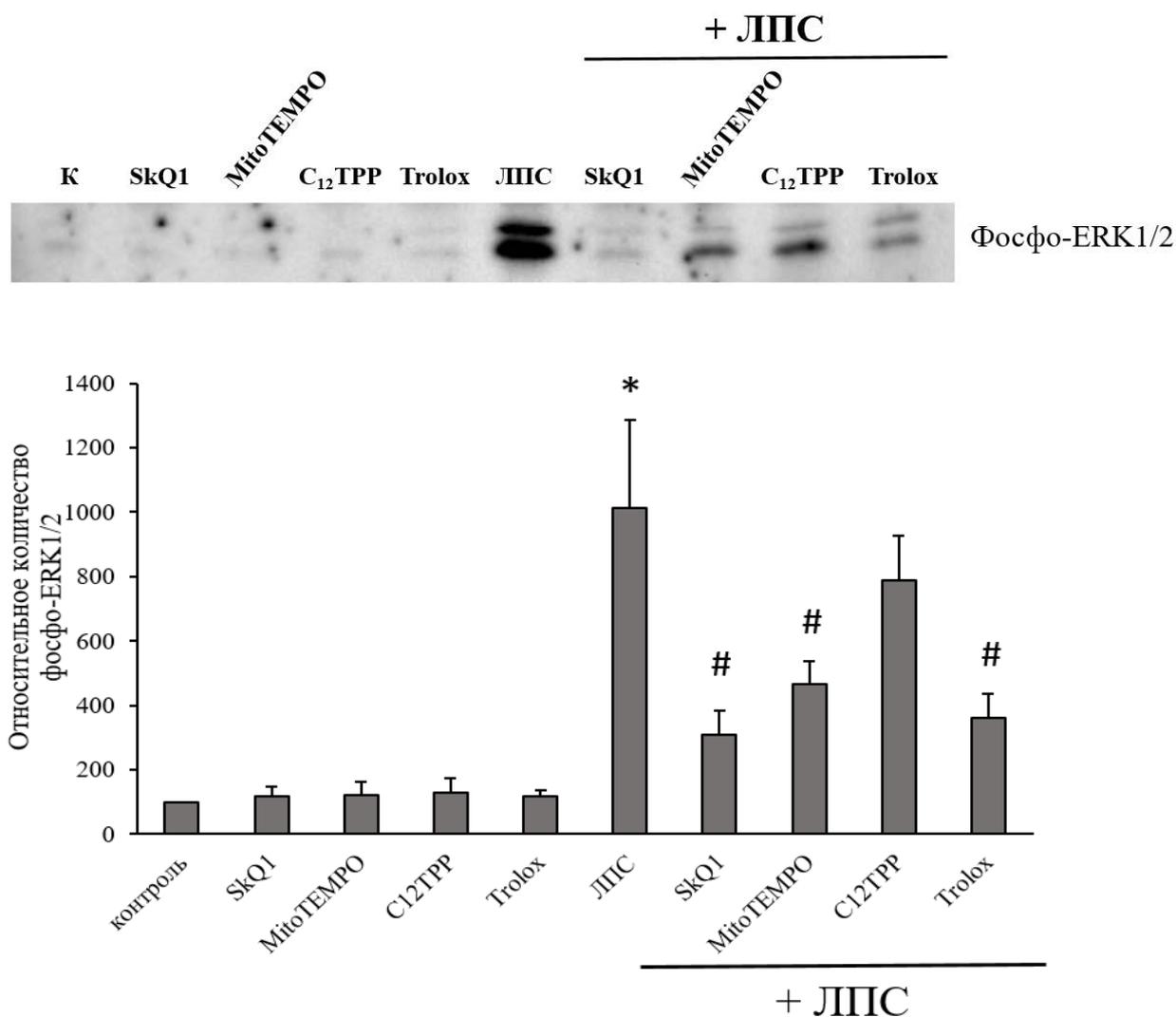


Рис. 36. Влияние митохондриальных и цитоплазматических АФК на уровень фосфорилирования MAP-киназы ERK1/2 под действием ЛПС в нейтрофилах человека.

Нейтрофилы инкубировали с митохондриально-направленными антиоксидантами (400 нМ SkQ1; 10 мкМ MitoTEMPO), разобщителем окислительного фосфорилирования (400 нМ C₁₂TRP) и классическим антиоксидантом (100 мкМ Trolox). Представлен репрезентативный вестерн-блот и денситометрический анализ данных. N=5; * p < 0.01 (относительно контроля), # p < 0.01 относительно ЛПС.

Таким образом, мы можем заключить, что механизм действия мтАФК может быть связан с MAP-киназами p38 и ERK1/2.

4.2.6. Подведение итогов главы 4.2

Итак, мы показали, что в условиях действия провоспалительных факторов снижение уровня мтАФК обладает таким же эффектом, что и снижение общего количества АФК, а именно – уменьшение уровня провоспалительной активации и выживаемости. Иначе говоря, уменьшение количества мтАФК приводит к общему уменьшению АФК в активированных нейтрофилах, что и было продемонстрировано нами с помощью флуоресцентного красителя DCF (Рис. 27). Однако неясно, как и на какие внутриклеточные пути влияют митохондрии. Мы предполагаем, что в нейтрофилах существует связь между митохондриями и НАДФН-оксидазой – основным, но не единственным источником АФК в нейтрофилах. Известно, что мтАФК могут влиять на продукцию АФК НАДФН-оксидазой: так, было показано, что окислительный взрыв нейтрофилов после воздействия fMLP значительно ингибировался митохондриально-направленным антиоксидантом SkQ1 (Vorobjeva *et al.*, 2017). Также имеются данные о том, что сборка НАДФН-оксидазы может ингибироваться митохондриально-направленным антиоксидантом MitoTEMPO (Kröller-Schön *et al.*, 2014). Таким образом, можно сказать, что эффект снижения мтАФК обусловлен снижением количества АФК, продуцируемых НАДФН-оксидазой. НАДФН-оксидаза, в свою очередь, влияет на некоторые известные белки-регуляторы сигнальных путей нейтрофилов, отвечающие за их активацию и выживаемость – например, NF-κB.

Это объяснение логично, но не исчерпывающе, поскольку известно, что в отсутствие функциональной НАДФН-оксидазы и продуцируемых ею АФК (например, у больных хроническим гранулёматозом), роль регулятора различных АФК-зависимых процессов (дегрануляция, нетоз) берут на себя митохондрии (Holland, 2010). То есть для некоторых процессов АФК, продуцируемые НАДФН-оксидазой, не являются абсолютно необходимыми. В пользу этого утверждения говорят наши данные о спонтанном апоптозе нейтрофилов: уменьшение мтАФК приводит к увеличению уровня апоптоза, а не к уменьшению, как бывает при добавлении классических антиоксидантов или в условиях гипоксии. Данный эффект, скорее всего, не связан с НАДФН-оксидазой, поскольку ингибиторы НАДФН-оксидазы не оказывают влияния на спонтанный апоптоз нейтрофилов, влияя на продолжительность жизни только активированных лейкоцитов (Perskvist *et al.*, 2002). Более того, продукция АФК интактными нейтрофилами не меняется под действием различных ингибиторов НАДФН-оксидазы, но увеличивается под действием антимицина (ингибитора третьего комплекса дыхательной цепи митохондрий); эффект последнего снимается добавлением митохондриально-направленного

антиоксиданта MitoQ (Van Raam, 2009). Также известно, что нейтрофилы без функциональной НАДФН-оксидазы у пациентов с хроническим гранулёматозом способны производить некоторое количество АФК, которое не увеличивается под действием РМА, известного активатора НАДФН-оксидазы. Более того, добавление антимицина откладывает апоптоз нейтрофилов, что согласуется с нашими данными. Таким образом, в спонтанном апоптозе неактивированных нейтрофилов главную роль играют мТАФК, не связанные с АФК, продуцируемыми НАДФН-оксидазой. И уменьшение мТАФК приводит к увеличению спонтанного апоптоза независимо от НАДФН-оксидазы.

Механизм влияния мТАФК на внутриклеточные сигнальные пути нейтрофилов малоизучен. По некоторым данным, мТАФК может регулировать экспрессию NIF-1 (фактора, увеличивающего выживаемость нейтрофилов в условиях гипоксии) и стабильность основного антиапоптотического белка Mcl-1 (Van Raam, 2009). Мы показали, что увеличение мТАФК увеличивает фосфорилирование MAP-киназ p38 и ERK1/2 в покоящихся нейтрофилах и не влияет на ЛПС-индуцируемую активацию данного каскада. Напротив, снижение мТАФК понижает фосфорилирование p38 под действием ЛПС, но не оказывает влияние на интактные нейтрофилы. Насколько данное влияние опосредовано НАДФН-оксидазой и продуцируемыми ею АФК, сказать пока нельзя – данный вопрос требует дальнейшего изучения.

Учитывая данные соображения, мы можем заключить, что мТАФК влияют не только на АФК, продуцируемые НАДФН-оксидазой, но и на некоторые другие процессы, которые ещё предстоит установить.

Стоит отметить важность полученных данных в контексте медицинских исследований. В настоящее время активно изучаются возможности применения митохондриально-направленных антиоксидантов для лечения множества заболеваний, в том числе воспалительного характера. Имеются многочисленные данные о том, что митохондриально-направленные антиоксиданты способны оказывать протекторный эффект как в различных животных моделях воспалительных заболеваний, так и в условиях *in vitro*. В частности, было показано, что в моделях сепсиса и ишемии-реперфузии сердца и почек введение антиоксидантов увеличивает выживаемость животных, уменьшает воспалительный ответ и улучшает функциональное состояние органов, снижает уровень окислительного стресса и количество провоспалительных цитокинов в плазме крови (Murphy and Smith, 2007; Lowes *et al.*, 2008; Powell *et al.*, 2015). Похожие эффекты (улучшение состояния, уменьшение воспалительного ответа, снижение

количества провоспалительных цитокинов) были показаны на животных моделях панкреатита (Weniger *et al.*, 2016), пиелонефрита (Plotnikov *et al.*, 2013), аутоиммунного энцефаломиелита (Mao, Manczak, Shirendeb, & Reddy, 2013), ревматоидного артрита (Andreev-Andrievskiy *et al.*, 2016) и аллергических реакций (Chelombitko *et al.*, 2017). Также известно, что митохондриально-направленные антиоксиданты оказывают благотворное влияние на заживление ран, ускоряя данный процесс и снижая вероятность развития хронического воспаления у старых и диабетических животных (Demyanenko *et al.*, 2017; Cano Sanchez *et al.*, 2018).

Несмотря на многочисленные данные о положительных эффектах применения митохондриально-направленных антиоксидантов при воспалительных процессах, молекулярные механизмы этих эффектов оставляют в тени, уделяя основное внимание гистологическим и организменным характеристикам. Мы считаем, что исследование процессов, происходящих на клеточном и субклеточном уровне в ходе воспаления, а также влияния митохондриальных АФК на эти процессы значительно расширит наше понимание действия митохондриально-направленных антиоксидантов, что позволит разрабатывать новые современные и эффективные противовоспалительные лекарства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Опираясь на результаты данной работы, можно утверждать, что компоненты митохондрий действительно способны вызывать провоспалительную активацию нейтрофилов человека. Однако, вопреки распространённому мнению, митохондриальная ДНК не является основным индуктором активации нейтрофилов, хотя и вносит свою лепту в этот процесс. Также мы показали, что активация нейтрофилов под действием митохондриальной ДНК опосредована рецептором TLR9, который распознаёт неметилированные CpG-участки бактериальной или вирусной ДНК. В норме на поверхности нейтрофилов количество данного рецептора невелико, поскольку основная его часть находится в эндосомах. Однако под действием праймирующего фактора (GM-CSF) увеличивается экспонирование TLR9 на поверхности нейтрофилов, что и позволяет внеклеточной митохондриальной ДНК связываться с ним и активировать нейтрофилы. Мы провели подобный эксперимент не только на выделенных нейтрофилах, но и на нейтрофилах цельной крови – и результаты совпали. Поэтому мы считаем, что модель праймирования релевантна для происходящего в организме, поскольку: во-первых, при разрушении клеток и митохондрий в кровь может попадать множество молекул, способных служить праймирующими агентами; во-вторых, при различных патологических состояниях уровень GM-CSF может быть повышен, что приводит к праймированию нейтрофилов и их активации в ответ на митохондриальную ДНК.

Также мы исследовали роль митохондрий нейтрофилов, в частности, митохондриальных АФК, как регуляторов провоспалительной активации и апоптоза. Нами показано, что при снижении уровня митохондриальных АФК происходит снижение активации нейтрофилов и увеличение уровня апоптоза как на фоне провоспалительных сигналов (ЛПС, fMLP), так и без них. Мы предполагаем, что влияние митохондриальных АФК связано как с регуляцией ими АФК, производимых НАДФН-оксидазой, так и с другими путями, для которых зависимость от АФК ещё не показана.

Интересно отметить, что в целом действие мтАФК и общих АФК синергично: при уменьшении количества первых уменьшается количество вторых – и в итоге это приводит к редукции провоспалительной активации нейтрофилов. Однако в случае небольших концентраций действие мтАФК и общих АФК противоположно: низкий уровень первых стимулирует апоптоз, в то время как вторых – напротив, увеличивает выживаемость нейтрофилов (Рис. 37).

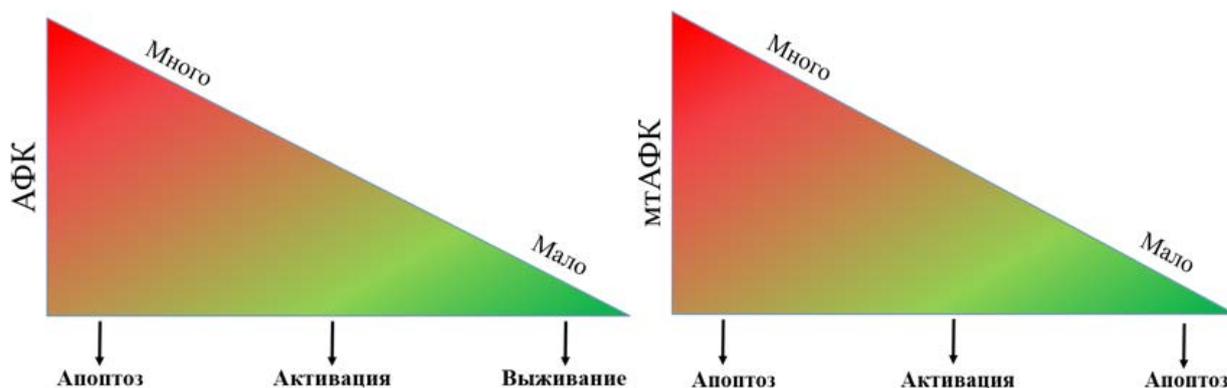


Рис. 37. Сравнение действия различных концентраций АФК и мТАФК на функционирование нейтрофилов.

Подводя итоги, можно сказать, что данное диссертационное исследование внесло значительный вклад в понимание роли митохондрий и их компонентов в развитии воспаления, а также показало значение мТАФК в провоспалительной активации и апоптозе нейтрофилов. Полученные результаты могут служить базисом для дальнейшего изучения роли митохондрий в воспалении, а также для разработки лекарственных препаратов на основе митохондриально-направленных антиоксидантов.

ВЫВОДЫ

1. Внеклеточная митохондриальная ДНК распознаётся нейтрофилами человека как образ опасности только в присутствии праймирующих агентов.
2. Механизм провоспалительного действия внеклеточной митохондриальной ДНК связан с TLR9-зависимым путём передачи сигнала.
3. Внеклеточная митохондриальная ДНК не вызывает активацию эндотелиальных клеток линии Ea.hy926.
4. Снижение уровня митохондриальных активных форм кислорода приводит к ослаблению провоспалительной активации и увеличению уровня апоптоза нейтрофилов человека.

БЛАГОДАРНОСТИ

Прежде всего, выражаю глубокую признательность Ольге Юрьевне Плетюшкиной, на энергии и неустанной активности которой держится наша лаборатория.

Также хочу поблагодарить Марию Вячеславовну Витушкину и Романа Алексеевича Зиновкина, положивших начало этому интересному исследованию.

Отдельную благодарность хочу выразить своим коллегам Ивану Ильичу Галкину, Ирине Михайловне Савченко, Ольге Петровне Ильинской и Марии Александровне Челомбитько за помощь в экспериментах, добрые советы и поддержку.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abo, A., Webb, M. R., Grogan, A., & Segal, A. W. (1994). Activation of NADPH oxidase involves the dissociation of p21rac from its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rhoGDI) followed by its translocation to the plasma membrane. *The Biochemical Journal*, 298 Pt 3, 585–591.
2. Akgul, C., & Edwards, S. W. (2003). Regulation of neutrophil apoptosis via death receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60(11), 2402–2408.
3. Altieri, D. C. (2010). Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms. *Biochem. J.*, 1;430(2), 199–205.
4. Altnauer, F., Conus, S., Cavalli, A., Folkers, G., & Simon, H. U. (2004). Calpain-1 Regulates Bax and Subsequent Smac-dependent Caspase-3 Activation in Neutrophil Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(7), 5947–5957.
5. Altnauer, F., Martinelli, S., Yousefi, S., Thürig, C., Schmid, I., Conway, E. M., ... Simon, H.-U. (2004). Inflammation-associated Cell Cycle-independent Block of Apoptosis by Survivin in Terminally Differentiated Neutrophils. *The Journal of Experimental Medicine*, 199(10), 1343–1354.
6. Andina, N., Conus, S., Schneider, E. M., Fey, M. F., & Simon, H. U. (2009). Induction of Bim limits cytokine-mediated prolonged survival of neutrophils. *Cell Death and Differentiation*, 16(9), 1248–1255.
7. Andreev-Andrievskiy, A. A., Kolosova, N. G., Stefanova, N. A., Lovat, M. V., Egorov, M. V., Manskikh, V. N., Lukashev, A. N. (2016). Efficacy of Mitochondrial Antioxidant Plastoquinonyl-decyl-triphenylphosphonium Bromide (SkQ1) in the Rat Model of Autoimmune Arthritis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1–9.
8. Antonenko, Y. N., Avetisyan, A. V, Bakeeva, Chernyak, B. V, Chertkov, V. A., Domnina, L. V, Ivanova O.Yu., Izuymov, D.S., Khailova, L.S., Klishin, S.S., Korshunova G.A., Lyamzaev K.G., Muntyan, M.S., Nepryakhina, O. K., Pashkovskaya, A. A., Pletjushkina, O. Yu., Pustovidko, A. V., Roginsky, V. A., Rokitskaya, T. I., Ruuge, E.K., Saprunova, V. B., Severina, I. I., Simonyan, R. A., Skulachev, I. V., Skulachev, M. V., Sumbatyan, N. V., Sviryaeva, I. V., Tashlitsky, V. N., Vassiliev, J. M., Vyssokikh, M. Yu., Yaguzhinsky, L. S., Zamyatnin, A A., Skulachev, V. P. (2008). Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 1. Cationic plastoquinone

- derivatives: synthesis and in vitro studies. *Biochemistry. Biokhimiia*, 73(12), 1273–1287.
9. Arai, Y., Nishinaka, Y., Arai, T., Morita, M., Mizugishi, K., Adachi, S., Takaori-Kondo, A., Watanabe, T., Yamashita, K. (2014). Uric acid induces NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 443(2), 556–561.
 10. Archibald, J. M. (2015). Endosymbiosis and Eukaryotic Cell Evolution. *Current Biology : CB*, 25(19), R911-21. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.07.055>
 11. Arruda, M. A., & Barja-Fidalgo, C. (2009). NADPH oxidase activity: In the crossroad of neutrophil life and death. *Frontiers in Bioscience, Volume*(14), 4546.
 12. Asehnoune, K., Strassheim, D., Mitra, S., Kim, J. Y., & Abraham, E. (2004). Involvement of reactive oxygen species in Toll-like receptor 4-dependent activation of NF-kappa B. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 172(4), 2522–2529.
 13. Ashkenazi, A., & Dixit, V. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science*, (281), 1305–1308.
 14. Bainton, D. F., & Farquhar, M. G. (1966). Origin of granules in polymorphonuclear leukocytes. Two types derived from opposite faces of the Golgi complex in developing granulocytes. *Journal of Cell Biology*, 28(2), 277–301.
 15. Baker, D., Giovannoni, G., & Schmierer, K. (2017). Marked neutropenia: Significant but rare in people with multiple sclerosis after alemtuzumab treatment. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 18, 181–183.
 16. Bakker, P. J., Scantlebery, A. M., Butter, L. M., Claessen, N., Teske, G. J. D., Van Der Poll, T., Florquin, S., Leemans, J. C. (2015). TLR9 mediates remote liver injury following severe renal ischemia reperfusion. *PLoS ONE*, 10(9), 1–14.
 17. Balogh, Z. J., McIlroy, D. J., Smith, D. W., & Hansbro, P. M. (2013). The origin and the role of mitochondrial DNA in postinjury inflammation. *Journal of Critical Care*, 28(6), 1099–1100.
 18. Bartels, M., Murphy, K., Rieter, E., & Bruin, M. (2016). Understanding chronic neutropenia: Life is short. *British Journal of Haematology*, 172(2), 157–169.
 19. Bass, J. I. F., Alvarez, M. E., Gabelloni, M. L., Vermeulen, M. E., Amaral, M. M., Geffner,

- J. R., & Trevani, A. S. (2008). GM-CSF enhances a CpG-independent pathway of neutrophil activation triggered by bacterial DNA. *Molecular Immunology*, *46*(1), 37–44.
20. Baumann, R., Casaulta, C., Simon, D., Conus, S., Yousefi, S., & Simon, H.-U. (2003). Macrophage migration inhibitory factor delays apoptosis in neutrophils by inhibiting the mitochondria-dependent death pathway. *The FASEB Journal*, *17*(15), 2221–2230.
<https://doi.org/10.1096/fj.03-0110com>
21. Belambri, S. A., Rolas, L., Raad, H., Hurtado-Nedelec, M., Dang, P. M.-C., & El-Benna, J. (2018). NADPH oxidase activation in neutrophils: Role of the phosphorylation of its subunits. *European Journal of Clinical Investigation*, (January), e12951.
22. Bellosta, S., Via, D., Canavesi, M., Pfister, P., Fumagalli, R., Paoletti, R., & Bernini, F. (1998). HMG-CoA reductase inhibitors reduce MMP-9 secretion by macrophages. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *18*(11), 1671–1678.
23. Bhagirath, V. C., Dwivedi, D. J., & Liaw, P. C. (2015). Comparison of the Proinflammatory and Procoagulant Properties of Nuclear, Mitochondrial, and Bacterial DNA. *Shock*, *44*(3), 265–271.
24. Bianchi, M., Hakkim, A., Brinkmann, V., Siler, U., Seger, R. A., Zychlinsky, A., & Reichenbach, J. (2009). Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood*, *114*(13), 2619–2622.
25. Birkenkamp, K. U., & Coffey, P. J. (2003). FOXO Transcription Factors as Regulators of Immune Homeostasis: Molecules to Die for? *The Journal of Immunology*, *171*(4), 1623–1629.
26. Borregaard, N. (2010). Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity*, *33*(5), 657–670.
27. Borregaard, N., & Herlin, T. (1982). Energy metabolism of human neutrophils during phagocytosis. *The Journal of Clinical Investigation*, *70*(3), 550–557.
28. Borregaard, N., Kjeldsen, L., Løllike, K., & Sengeløv, H. (1995). Granules and secretory vesicles of the human neutrophil. *Clinical and Experimental Immunology*, *101*(SUPPL.1), 6–9.
29. Bowie, A., & O'Neill, L. A. (2000). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *Journal of Leukocyte Biology*, *67*(4), 508–514.

30. Branzk, N., & Papayannopoulos, V. (2013). Molecular mechanisms regulating NETosis in infection and disease. *Seminars in Immunopathology*, 35(4), 513–530.
31. Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., ... Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5663), 1532–1535.
32. Brookes, P. S. (2004). Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *AJP: Cell Physiology*, 287(4), C817–C833.
33. Brown, S. B., & Savill, J. (1999). Phagocytosis Triggers Macrophage Release of Fas Ligand and Induces Apoptosis of Bystander Leukocytes. *The Journal of Immunology*, 162(1), 480–485.
34. Burgoyne, R. D., & Morgan, A. (2003). Secretory Granule Exocytosis. *Physiological Reviews*, 83(2), 581–632.
35. Burns, A., Walker, D., Brown, E., Thurmon, L., Bowden, R., Keese, C., ... Smith, C. (1997). Neutrophil transendothelial migration is independent of tight junctions and occurs preferentially at tricellular corners. *J. Immunol*, 159 (6), 2893–2903.
36. Cai, J. H., Deng, S., Kumpf, S. W., Lee, P. A., Zagouras, P., Ryan, A., & Gallagher, D. S. (2007). Validation of rat reference genes for improved quantitative gene expression analysis using low density arrays. *BioTechniques*, 42(4), 503–512.
37. Calfee, C. S., & Matthay, M. A. (2010). Culprits with evolutionary ties. *Nature*, 464(7285), 41–42.
38. Cano Sanchez, M., Lancel, S., Boulanger, E., & Neviere, R. (2018). Targeting Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in the Treatment of Impaired Wound Healing: A Systematic Review. *Antioxidants*, 7(8), 98.
39. Carman, C. V., Sage, P. T., Sciuto, T. E., de la Fuente, M. A., Geha, R. S., Ochs, H. D. D., ... Springer, T. A. (2007). Transcellular Diapedesis Is Initiated by Invasive Podosomes. *Immunity*, 26(6), 784–797.
40. Carman, C. V., & Springer, T. A. (2008). Trans-cellular migration: cell-cell contacts get intimate. *Current Opinion in Cell Biology*, 20(5), 533–540.
41. Carman, C. V., & Springer, T. A. (2004). A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both

- through individual vascular endothelial cells and between them, *167*(2), 377–388.
42. Chandel, N. S., McClintock, D. S., Feliciano, C. E., Wood, T. M., Melendez, J. A., Rodriguez, A. M., & Schumacker, P. T. (2000). Reactive Oxygen Species Generated at Mitochondrial Complex III Stabilize Hypoxia-inducible Factor-1 α during Hypoxia. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(33), 25130–25138.
 43. Chanock, S. J., Benna, J. El, Smith, R. M., & Babior, B. M. (1994). Minireview The Respiratory Burst Oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, *40*(15), 24519–24522.
 44. Chelombitko, M. A., Averina, O. A., Vasil'eva, T. V., Dvorianinova, E. E., Egorov, M. V., Pletjushkina, O. Y., Popova, E.N., Fedorov, A.V., Romaschenko V.P., Ilyinskaya, O. P. (2017). Comparison of the Effects of Mitochondria-Targeted Antioxidant 10-(6'-Plastoquinonyl)Decyltriphenylphosphonium Bromide (SkQ1) and a Fragment of its Molecule Dodecyltriphenylphosphonium on Carrageenan-Induced Acute Inflammation in Mouse Model of Subcuteneo. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, *162*(6), 730–733.
 45. Cinamon, G., Shinder, V., Shamri, R., & Alon, R. (2004). Chemoattractant Signals and 2 Integrin Occupancy at Apical Endothelial Contacts Combine with Shear Stress Signals to Promote Transendothelial Neutrophil Migration. *The Journal of Immunology*, *173*(12), 7282–7291.
 46. Cowburn, A. S., Cadwallader, K. A., Reed, B. J., Farahi, N., & Chilvers, E. R. (2002). Role of PI3-kinase-dependent Bad phosphorylation and altered transcription in cytokine-mediated neutrophil survival. *Blood*, *100*(7), 2607–2616.
 47. Crossley, L. J. (2003). Neutrophil activation by fMLP regulates FOXO (forkhead) transcription factors by multiple pathways, one of which includes the binding of FOXO to the survival factor Mcl-1. *Journal of Leukocyte Biology*, *74*(4), 583–592.
 48. D'Amelio, M., Cavallucci, V., & Cecconi, F. (2010). Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. *Cell Death & Differentiation*, *17*(7), 1104–1114.
 49. Dale, D. C., Boxer, L., & Liles, W. C. (2008). The phagocytes - neutrophils and monocytes. *Blood*, *112*(4), 935–946.
 50. Dan Dunn, J., Alvarez, L. A., Zhang, X., & Soldati, T. (2015). Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. *Redox Biology*, *6*, 472–485.

51. Daniels, R. H., Finnen, M. J., Hill, M. E., & Lackie, J. M. (1992). Recombinant human monocyte IL-8 primes NADPH-oxidase and phospholipase A2 activation in human neutrophils. *Immunology*, 75(1), 157–163.
52. Das, S., Bhattacharyya, S., Ghosh, S., & Majumdar, S. (1999). TNF-alpha induced altered signaling mechanism in human neutrophil. *Mol Cell Biochem*, ((1-2)), 97–108.
- Demyanenko, I. A., Zakharova, V. V., Ilyinskaya, O. P., Vasilieva, T. V., Fedorov, A. V., Manskikh, V. N., ... Popova, E. N. (2017). Mitochondria-Targeted Antioxidant SkQ1 Improves Dermal Wound Healing in Genetically Diabetic Mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1–10.
53. Derouet, M., Thomas, L., Cross, A., Moots, R. J., & Edwards, S. W. (2004). Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor Signaling and Proteasome Inhibition Delay Neutrophil Apoptosis by Increasing the Stability of Mcl-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(26), 44–51.
54. Desai, J., Mulay, S. R., & Nakazawa, D. (2016). Matters of life and death . How neutrophils die or survive along NET release and is ““ NETosis ”” = necroptosis ? *Cellular and Molecular Life Sciences*.
55. Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (45).
56. Dewald, B., & Baggiolini, M. (1985). Activation of NADPH oxidase in human neutrophils. Synergism between fMLP and the neutrophil products PAF and LTB4. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 128(1), 297–304.
57. Dib, B., Lin, H., Maidana, D. E., Tian, B., Miller, J. B., Bouzika, P., ... Vavvas, D. G. (2015). Mitochondrial DNA has a pro-inflammatory role in AMD. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1853(11), 2897–2906.
58. Dibbert, B., Weber, M., Nikolaizik, W., Vogt, P., Schoni, M., Blaser, K., & Simon, H. (1999). Cytokine-mediated Bax deficiency and consequent delayed neutrophil apoptosis: a general mechanism to accumulate effector cells in inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(23), 13330–13335.
59. Duffin, R., Leitch, A. E., Fox, S., Haslett, C., & Rossi, A. G. (2010). Targeting granulocyte apoptosis: Mechanisms, models, and therapies. *Immunological Reviews*, 236(1), 28–40.

60. Dunican, A., Leuenroth, S., Grutkoski, P., Ayala, A., & Simms, H. (2000). TNFalpha-induced suppression of PMN apoptosis is mediated through interleukin-8 production. *Shock*, *14*(3), 284–288.
61. Edgell, C. J., McDonald, C. C., & Graham, J. B. (1983). Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *80*(12), 3734–3737.
62. Edwards, S. W., Hallett, M. B., & Campbell, A. K. (1984). Oxygen-radical production during inflammation may be limited by oxygen concentration. *The Biochemical Journal*, *217*(3), 851–854.
63. El-Benna, J., Dang, P. M., & Gougerot-Pocidalò, M.-A. (2008). Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Seminars in Immunopathology*, *30*(3), 279–289.
64. El-Benna, J., Hurtado-Nedelec, M., Marzaioli, V., Marie, J.-C., Gougerot-Pocidalò, M.-A., & Dang, P. M.-C. (2016). Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. *Immunological Reviews*, *273*(1), 180–193.
65. Farkas, A. M., Kilgore, T. M., & Lotze, M. T. (2007). Detecting DNA: getting and begetting cancer. *Current Opinion in Investigational Drugs (London, England : 2000)*, *8*(12), 981–986.
66. Ferrante, A., & Thong, Y. H. (1980). Optimal conditions for simultaneous purification of mononuclear and polymorphonuclear leucocytes from human blood by the Hypaque-Ficoll method. *Journal of Immunological Methods*, *36*(2), 109–117.
67. Fossati, G., Moulding, D. A., Spiller, D. G., Moots, R. J., White, M. R. H., & Edwards, S. W. (2003). The Mitochondrial Network of Human Neutrophils: Role in Chemotaxis, Phagocytosis, Respiratory Burst Activation, and Commitment to Apoptosis. *The Journal of Immunology*, *170*(4), 1964–1972.
68. Fuchs, T. A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., ... Zychlinsky, A. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *Journal of Cell Biology*, *176*(2), 231–241.
69. Geering, B., Gurzeler, U., Federzoni, E., Kaufmann, T., Simon, H., & De, W. (2011). A novel TNFR1-triggered apoptosis pathway mediated by class IA PI3Ks in neutrophils.

Hematology, 117(22), 5953–5962.

70. Guimaraes-Costa, A. B., Nascimento, M. T. C., Froment, G. S., Soares, R. P. P., Morgado, F. N., Conceicao-Silva, F., & Saraiva, E. M. (2009). Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(16), 6748–6753.
71. Gutkind, J. S., & Robbins, K. C. (1989). Translocation of the FGR protein-tyrosine kinase as a consequence of neutrophil activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(22), 8783–8787.
72. Hakkim, A., Fuchs, T. A., Martinez, N. E., Hess, S., Prinz, H., Zychlinsky, A., & Waldmann, H. (2011). Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nature Chemical Biology*, 7(2), 75–77.
73. Hayashi, F., Means, T. K., & Luster, A. D. (2003). Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*, 102(7), 2660–2669.
74. Hazeldine, J., Hampson, P., Opoku, F. A., Foster, M., & Lord, J. M. (2015). N-Formyl peptides drive mitochondrial damage associated molecular pattern induced neutrophil activation through ERK1/2 and P38 MAP kinase signalling pathways. *Injury*, 46(6), 975–984.
75. Haziot, A., Ferrero, E., Köntgen, F., Hijiya, N., Yamamoto, S., Silver, J., ... Goyert, S. M. (1996). Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. *Immunity*, 4(4), 407–414.
76. Hellberg, L., Fuchs, S., Gericke, C., Sarkar, A., Behnen, M., Solbach, W., & Laskay, T. (2011). Proinflammatory Stimuli Enhance Phagocytosis of Apoptotic Cells by Neutrophil Granulocytes. *The Scientific World JOURNAL*, 11, 2230–2236.
77. Herant, M. (2006). Mechanics of neutrophil phagocytosis: experiments and quantitative models. *Journal of Cell Science*, 119(9), 1903–1913.
78. Hirsch, J. G. (1962). Cinemicrophotographic observations on granule lysis in polymorphonuclear leucocytes during phagocytosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 116, 827–834.
79. Holland, S. M. (2010). Chronic granulomatous disease. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 38(1), 3–10.

80. Iba, T., Hashiguchi, N., Nagaoka, I., Tabe, Y., & Murai, M. (2013). Neutrophil cell death in response to infection and its relation to coagulation. *Journal of Intensive Care*, *1*(1), 13.
81. Ishii, K. J., & Akira, S. (2006). Innate immune recognition of, and regulation by, DNA. *Trends in Immunology*, *27*(11), 525–532.
82. Itagaki, K., & Hauser, C. J. (2010). Circulating Mitochondrial DAMPs Cause Inflammatory Responses to Injury. *Nature*, *464*(7285), 104–107.
83. Jones, S. A., Wolf, M., Qin, S., Mackay, C. R., & Baggiolini, M. (1996). Different functions for the interleukin 8 receptors (IL-8R) of human neutrophil leukocytes: NADPH oxidase and phospholipase D are activated through IL-8R1 but not IL-8R2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(13), 6682–6686.
84. Jonsson, H., Allen, P., & Peng, S. L. (2005). Inflammatory arthritis requires Foxo3a to prevent Fas ligand-induced neutrophil apoptosis. *Nature Medicine*, *11*(6), 666–671.
85. Karlsson, A., & Dahlgren, C. (2002). Assembly and activation of the neutrophil NADPH oxidase in granule membranes. *Antioxidants & Redox Signaling*, *4*(1), 49–60.
86. Kasahara, Y., Iwai, K., Yachie, A., Ohta, K., Konno, A., Seki, H., Miyawaki, T., Taniguchi, N. (1997). Involvement of reactive oxygen intermediates in spontaneous and CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis of neutrophils. *Blood*, *89*(5), 1748–1753.
87. Katayama, Y., Hidalgo, A., Chang, J., Peired, A., & Frenette, P. S. (2005). CD44 is a physiological E-selectin ligand on neutrophils. *The Journal of Experimental Medicine*, *201*(8), 1183–1189. <https://doi.org/10.1084/jem.20042014>
88. Keshari, R. S., Verma, A., Barthwal, M. K., & Dikshit, M. (2013). Reactive oxygen species-induced activation of ERK and p38 MAPK mediates PMA-induced NETs release from human neutrophils. *Journal of Cellular Biochemistry*, *114*(3), 532–540.
89. Kim, D., & Haynes, C. L. (2013). The role of p38 MAPK in neutrophil functions: single cell chemotaxis and surface marker expression. *The Analyst*, *138*(22), 6826.
90. King, M. P., & Attardi, G. (1996). Isolation of human cell lines lacking mitochondrial DNA. *Methods in Enzymology*, *264*, 304–313.
91. Kjeldsen, L., Sengeløv, H., Lollike, K., Nielsen, M. H., & Borregaard, N. (1994). Isolation and characterization of gelatinase granules from human neutrophils. *Blood*, *83*(6), 1640–

1649.

92. Ko, Y. P., Kuipers, A., Freitag, C. M., Jongerius, I., Medina, E., van Rooijen, W. J., Rooijackers, S. H. M. (2013). Phagocytosis Escape by a *Staphylococcus aureus* Protein That Connects Complement and Coagulation Proteins at the Bacterial Surface. *PLoS Pathogens*, 9(12), 1–13.
93. Kobayashi, S., Yamashita, K., Takeoka, T., Ohtsuki, T., Suzuki, Y., Takahashi, R., Yamamoto, K., Kaufmann, S. H., Uchiyama, T. Sasada, M., Takahashi, A. (2002). Calpain-mediated X-linked inhibitor of apoptosis degradation in neutrophil apoptosis and its impairment in chronic neutrophilic leukemia. *Journal of Biological Chemistry*, 277(37), 33968–33977.
94. Kröller-Schön, S., Steven, S., Kossmann, S., Scholz, A., Daub, S., Oelze, M., ... Daiber, A. (2014). Molecular mechanisms of the crosstalk between mitochondria and NADPH oxidase through reactive oxygen species-studies in white blood cells and in animal models. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(2), 247–266.
95. Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S. (2009). Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 388(4), 621–625.
96. Kumar, S., Ingle, H., Prasad, D. V. R., & Kumar, H. (2013). Recognition of bacterial infection by innate immune sensors. *Critical Reviews in Microbiology*, 39(3), 229–246.
97. Kumar, V., Fausto, N., & Abbas, A. (2005). *Pathologic Basis of Disease*.
98. Lacy, P. (2006). Mechanisms of Degranulation in Neutrophils. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 2(3), 98.
99. Lam, N. Y. L., Rainer, T. H., Chiu, R. W. K., Joynt, G. M., & Lo, Y. M. D. (2004). Plasma mitochondrial DNA concentrations after trauma. *Clinical Chemistry*, 50(1), 213–216.
100. Latz, E., Schoenemeyer, A., Visintin, A., Fitzgerald, K. A., Monks, B. G., Knetter, C. F., ... Golenbock, D. T. (2004). TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nature Immunology*, 5(2), 190–198.
101. Lee, W. L., Harrison, R. E., & Grinstein, S. (2003). Phagocytosis by neutrophils. *Microbes and Infection*, 5(14), 1299–1306.
102. Lefort, C. T., Rossaint, J., Moser, M., Petrich, B. G., Zarbock, A., Monkley, S. J., Critchley,

- D. R., Ginsberg, M. H., Fässler, R., Ley, K. (2012). Distinct roles for talin-1 and kindlin-3 in LFA-1 extension and affinity regulation. *Blood*, *119*(18), 4275–4282.
103. Leifer, C. A., Kennedy, M. N., Mazzoni, A., Lee, C., Kruhlak, M. J., & Segal, D. M. (2004). TLR9 is localized in the endoplasmic reticulum prior to stimulation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *173*(2), 1179–1183.
104. Leitch, A. E., Riley, N. A., Sheldrake, T. A., Festa, M., Fox, S., Duffin, R., Haslett, C., Rossi, A. G. (2010). The cyclin-dependent kinase inhibitor R-roscovitine down-regulates Mcl-1 to override pro-inflammatory signalling and drive neutrophil apoptosis. *European Journal of Immunology*, *40*(4), 1127–1138.
105. Lerman, Y. V., & Kim, M. (2015). Neutrophil Migration under normal and sepsis conditions. *Cardiovasc Hematol Disors Drug Targets*, *91*(2), 165–171.
106. Leuenroth, S. J., Grutkoski, P. S., Ayala, A., & Simms, H. H. (2000). The loss of Mcl-1 expression in human polymorphonuclear leukocytes promotes apoptosis Abstract : The regulation of polymorphonuclear leukocyte (PMN) apoptosis can influence the dura-localized to the nucleus and cytoplasm and that culture . Reducing ava. *Journal of Leukocyte Biology*.
107. Liles, W. C., Kiener, P. A., Ledbetter, J. A., Aruffo, A., & Klebanoff, S. J. (1996). Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes: implications for the regulation of apoptosis in neutrophils. *The Journal of Experimental Medicine*, *184*(2), 429–440.
108. Lilius, E.-M., & Nuutila, J. (2012). Bacterial infections, DNA virus infections, and RNA virus infections manifest differently in neutrophil receptor expression. *TheScientificWorldJournal*, *2012*, 527347.
109. Lindau, D., Mussard, J., Rabsteyn, A., Ribon, M., Kötter, I., Igney, A., ... Decker, P. (2014). TLR9 independent interferon α production by neutrophils on NETosis in response to circulating chromatin, a key lupus autoantigen. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *73*(12), 2199–2207.
110. Lindau, D., Mussard, J., Wagner, B. J., Ribon, M., Rönnefarth, V. M., Quettier, M., ... Decker, P. (2013). Primary blood neutrophils express a functional cell surface Toll-like receptor 9. *European Journal of Immunology*, *43*(8), 2101–2113.

111. Lindau, M., & Almers, W. (1995). Structure and function of fusion pores in exocytosis and ectoplasmic membrane fusion. *Current Opinion in Cell Biology*, 7(4), 509–517.
[https://doi.org/10.1016/0955-0674\(95\)80007-7](https://doi.org/10.1016/0955-0674(95)80007-7)
112. Lioté, F., Boval-Boizard, B., Weill, D., Kuntz, D., & Wautier, J. L. (1996). Blood monocyte activation in rheumatoid arthritis: Increased monocyte adhesiveness, integrin expression, and cytokine release. *Clinical and Experimental Immunology*, 106(1), 13–19.
113. Liu, S., Kiosses, W. B., Rose, D. M., Slepak, M., Salgia, R., Griffin, J. D., ... Ginsberg, M. H. (2002). A fragment of paxillin binds the $\alpha 4$ integrin cytoplasmic domain (tail) and selectively inhibits $\alpha 4$ -mediated cell migration. *Journal of Biological Chemistry*, 277(23), 20887–20894.
114. Liu, W., Liu, Y., Li, H., & Rodgers, G. P. (2018). Olfactomedin 4 contributes to hydrogen peroxide-induced NADPH oxidase activation and apoptosis in mouse neutrophils. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 315(4), C494–C501.
115. Lood, C., Blanco, L. P., Purmalek, M. M., Carmona-Rivera, C., De Ravin, S. S., Smith, C. K., ... Kaplan, M. J. (2016). Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. *Nature Medicine*, 22(2), 146–153.
116. Lowes, D. A., Thottakam, B. M. V., Webster, N. R., Murphy, M. P., & Galley, H. F. (2008). The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ protects against organ damage in a lipopolysaccharide–peptidoglycan model of sepsis. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(11), 1559–1565.
117. Maianski, N. a, Geissler, J., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Roos, D., & Kuijpers, T. W. (2004). Functional characterization of mitochondria in neutrophils: a role restricted to apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 11(2), 143–153.
118. Maianski, N. a, Roos, D., & Kuijpers, T. W. (2003). Tumor necrosis factor alpha induces a caspase-independent death pathway in human neutrophils. *Blood*, 101(5), 1987–1995.
119. Mamdouh, Z., Chen, X., Pierini, L. M., & Maxfield, F. R. (2003). Targeted recycling of PECAM from endothelial surface-connected compartments during diapedesis. *Nature*, 421(February), 748–753.
120. Manda-Handzlik, A., & Demkow, U. (2015). Neutrophils: The Role of Oxidative and

Nitrosative Stress in Health and Disease. *Adv. Exp. Medicine, Biology-Neuroscience and respiration*. pp. 51–60.

121. Mantovani, A., Cassatella, M. a, Costantini, C., & Jaillon, S. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews. Immunology*, *11*(8), 519–531.
122. Mao, P., Manczak, M., Shirendeb, U. P., & Reddy, P. H. (2013). MitoQ, a mitochondria-targeted antioxidant, delays disease progression and alleviates pathogenesis in an experimental autoimmune encephalomyelitis mouse model of multiple sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1832*(12), 2322–2331.
123. Marciano, B. E., Spalding, C., Fitzgerald, A., Mann, D., Brown, T., Osgood, S., ... Holland, S. M. (2015). Common severe infections in chronic granulomatous disease. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, *60*(8), 1176–1183.
124. Martin, C., Burdon, P. C. E., Bridger, G., Williams, T. J., Rankin, S. M., & In, V. Y. (2003). Chemokines Acting via CXCR2 and CXCR4 Control the Release of Neutrophils from the Bone Marrow and Their Return following Senescence. *Immunity*, *19*, 583–593.
125. Martin, D. A., & Elkon, K. B. (2006). Intracellular mammalian DNA stimulates myeloid dendritic cells to produce type I interferons predominantly through a Toll-like receptor 9-independent pathway. *Arthritis and Rheumatism*, *54*(3), 951–962.
126. Marutani, T., Hattori, T., Tsutsumi, K., Koike, Y., Harada, A., Noguchi, K., ... Mukai, H. (2015). Mitochondrial protein-derived cryptides: are endogenous N-formylated peptides including mitocryptide-2 components of mitochondrial damage-associated molecular patterns? *Biopolymers*, 1–34.
127. Mastej, K., & Adamiec, R. (2008). Neutrophil surface expression of CD11b and CD62L in diabetic microangiopathy. *Acta Diabetologica*, *45*(3), 183–190.
128. May, R. C., & Machesky, L. M. (2001). Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *Journal of Cell Science*, *114*(Pt 6), 1061–1077.
129. Mccaffrey, P. G., Newsome, D. A., Fibach, E., Yoshida, M., & Su, M. S. (2015). Regulation of Neutrophil Apoptosis by Tumor Necrosis Factor- α : Requirement for TNFR55 and TNFR75 for Induction of Apoptosis In Vitro. *Blood*, *90*, 2772–2783.

130. McCormick, A., Heesemann, L., Wagener, J., Marcos, V., Hartl, D., Loeffler, J., ... Ebel, F. (2010). NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Microbes and Infection*, *12*(12–13), 928–936.
131. McEver, R., & Cummings, R. D. (1997). Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *Journal of Clinical Investigation*, *100*(3), 485–492.
132. McLeish, K. R., Knall, C., Ward, R. a, Gerwins, P., Coxon, P. Y., Klein, J. B., & Johnson, G. L. (1998). Activation of mitogen-activated protein kinase cascades during priming of human neutrophils by TNF-alpha and GM-CSF. *Journal of Leukocyte Biology*, *64*(4), 537–545.
133. Medema, J. P., Scaffidi, C., Kischkel, F. C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P. H., & Peter, M. E. (1997). FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO Journal*, *16*(10), 2794–2804.
134. Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, *449*(7164), 819–826.
135. Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, *454*(7203), 428–435.
136. Melley, D. D., Evans, T. W., & Quinlan, G. J. (2005). Redox regulation of neutrophil apoptosis and the systemic inflammatory response syndrome. *Clinical Science (London, England : 1979)*, *108*(5), 413–424. <https://doi.org/10.1042/CS20040228>
137. Metzler, K. D., Fuchs, T. A., Nauseef, W. M., Reumaux, D., Roesler, J., Schulze, I., ... Zychlinsky, A. (2016). Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation : implications for innate immunity. *Blood*, *117*(3), 953–960.
138. Metzler, K. D., Goosmann, C., Lubojemska, A., Zychlinsky, A., & Papayannopoulos, V. (2014). Myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. *Cell Reports*, *8*(3), 883–896.
139. Middleton, J., Patterson, A. M., Gardner, L., Schmutz, C., & Ashton, B. A. (2002). Leukocyte extravasation: Chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood*, *100*(12), 3853–3860.
140. Millán, J., Hewlett, L., Glyn, M., Toomre, D., Clark, P., & Ridley, A. J. (2006). Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to

- caveola- and F-actin-rich domains. *Nature Cell Biology*, 8(2), 113–123.
141. Mocsai, A., Jakus, Z., Vantus, T., Berton, G., Lowell, C. A., & Ligeti, E. (2000). Kinase Pathways in Chemoattractant-Induced Degranulation of Neutrophils: The Role of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activated by Src Family Kinases. *The Journal of Immunology*, 164(8), 4321–4331.
 142. Moulding, D. a, Akgul, C., Derouet, M., White, M. R., & Edwards, S. W. (2001). BCL-2 family expression in human neutrophils during delayed and accelerated apoptosis. *Journal of Leukocyte Biology*, 70(5), 783–792.
 143. Muller, W. A. (2013). Getting leukocytes to the site of inflammation. *Veterinary Pathology*, 50(1), 7–22.
 144. Murphy, B. M., O’Neill, A. J., Adrain, C., Watson, R. W. G., & Martin, S. J. (2003). The Apoptosome Pathway to Caspase Activation in Primary Human Neutrophils Exhibits Dramatically Reduced Requirements for Cytochrome *c*. *The Journal of Experimental Medicine*, 197(5), 625–632.
 145. Murphy, M. P., & Smith, R. A. J. (2007). Targeting Antioxidants to Mitochondria by Conjugation to Lipophilic Cations. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47(1), 629–656.
 146. Muzio, M., Stockwell, B. R., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., & Dixit, V. M. (1998). An induced proximity model for caspase-8 activation. *Journal of Biological Chemistry*, 273(5), 2926–2930.
 147. Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell*, 88(3), 355–365.
 148. Nakahira, K., Hisata, S., & Choi, A. M. K. (2015). The Roles of Mitochondrial Damage-Associated Molecular Patterns in Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 23(17), 1329–1350.
 149. Narayanan, P. K., Ragheb, K., Lawler, G., & Robinson, J. P. (1997). Defects in intracellular oxidative metabolism of neutrophils undergoing apoptosis. *Journal of Leukocyte Biology*, 61(4), 481–488.
 150. Nguyen, G. T., Green, E. R., & Meccas, J. (2017). Neutrophils to the ROScue: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(August), 1-24.

151. Niemiec, M. J., De Samber, B., Garrevoet, J., Vergucht, E., Vekemans, B., De Rycke, R., Björn, E., Sandblad, L., Wellenreuther, G., Falkenberg, G., Cloetens, P., Vincze, L., Urban, C. F. (2015). Trace element landscape of resting and activated human neutrophils on the sub-micrometer level. *Metallomics : Integrated Biometal Science*, 7(6), 996–1010.
152. Nishinaka, Y., Arai, T., Adachi, S., Takaori-Kondo, A., & Yamashita, K. (2011). Singlet oxygen is essential for neutrophil extracellular trap formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 413(1), 75–79.
153. O'Mahony, D. S., Pham, U., Iyer, R., Hawn, T. R., & Liles, W. C. (2008). Differential constitutive and cytokine-modulated expression of human Toll-like receptors in primary neutrophils, monocytes, and macrophages. *International Journal of Medical Sciences*, 5(1), 1–8.
154. O'Neill, L. A. J., & Bowie, A. G. (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, 7(5), 353–364.
155. Oishi, K., & Machida, K. (1997). Inhibition of neutrophil apoptosis by antioxidants in culture medium. *Scandinavian Journal of Immunology*, 45(1), 21–27.
156. Oka, T., Hikoso, S., Yamaguchi, O., Taneike, M., Takeda, T., Tamai, T., ... Otsu, K. (2012). Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure. *Nature*, 490(7419), 292.
157. Osman, C., Voelker, D. R., & Langer, T. (2011). Making heads or tails of phospholipids in mitochondria. *The Journal of Cell Biology*, 192(1), 7–16.
158. Papayannopoulos, V., Metzler, K. D., Hakkim, A., & Zychlinsky, A. (2010). Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *Journal of Cell Biology*, 191(3), 677–691.
159. Parker, H., Dragunow, M., Hampton, M. B., Kettle, A. J., & Winterbourn, C. C. (2012). Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. *Journal of Leukocyte Biology*, 92(4), 841–849.
160. Patiño, P. J., Perez, J. E., Lopez, J. A., Condino-Neto, A., Grumach, A. S., Botero, J. H., Curnutte, J. T., García de Olarte, D. (1999). Molecular analysis of chronic granulomatous disease caused by defects in gp91-phox. *Human Mutation*, 13(1), 29–37.
161. Paunel-Görgülü, A., Wacker, M., El Aita, M., Hassan, S., Schlachtenberger, G., Deppe, A.,

- Choi, Y. H., Kuhn, E., Mehler, T. O., Wahlers, T. (2017). CfDNA correlates with endothelial damage after cardiac surgery with prolonged cardiopulmonary bypass and amplifies NETosis in an intracellular TLR9-independent manner. *Scientific Reports*, 7(1), 1–13.
162. Perskvist, N., Long, M., Stendahl, O., & Zheng, L. (2002). Mycobacterium tuberculosis Promotes Apoptosis in Human Neutrophils by Activating Caspase-3 and Altering Expression of Bax/Bcl-x. *The Journal of Immunology*, 168(18), 6358–6365.
163. Peschel, A., & Hartl, D. (2012). Anuclear neutrophils keep hunting. *Nature Medicine*, 18(9), 1336–1338.
164. Petri, B., Phillipson, M., & Kubes, P. (2008). The Physiology of Leukocyte Recruitment: An In Vivo Perspective. *The Journal of Immunology*, 180(10), 6439–6446.
165. Pillay, J., Braber, I. Den, Vrisekoop, N., Kwast, L. M., Boer, R. J. De, Borghans, A. M., ... Koenderman, L. (2010). Brief report In vivo labeling with $^2\text{H}_2\text{O}$ reveals a human neutrophil lifespan of 5 . 4 days. *Blood*, 116(4), 625–627.
166. Pilsczek, F. H., Salina, D., Poon, K. K. H., Fahey, C., Yipp, B. G., Sibley, C. D., Robbins, S. M., Green, F. H. Y., Surette, M. G., Sugai, M., Bowden, M. G., Hussain, M., Zhang, K. Kubes, P. (2010). A Novel Mechanism of Rapid Nuclear Neutrophil Extracellular Trap Formation in Response to Staphylococcus aureus. *The Journal of Immunology*, 185(12), 7413–7425.
167. Piret, J. P., Minet, E., Cosse, J. P., Ninane, N., Debaq, C., Raes, M., & Michiels, C. (2005). Hypoxia-inducible factor-1-dependent overexpression of myeloid cell factor-1 protects hypoxic cells against tert-butyl hydroperoxide-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 280(10), 9336–9344.
168. Plotnikov, E. Y., Morosanova, M. A., Pevzner, I. B., Zorova, L. D., Manskikh, V. N., Pulkova, N. V., Galkina, S. I., Skulachev, V. P., Zorov, D. B. (2013). Protective effect of mitochondria-targeted antioxidants in an acute bacterial infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(33), E3100–E3108.
169. Powell, R. D., Swet, J. H., Kennedy, K. L., Huynh, T. T., Murphy, M. P., Mckillop, I. H., & Evans, S. L. (2015). MitoQ modulates oxidative stress and decreases inflammation following hemorrhage. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 78(3), 573–579.

170. Prikhodko, A. S., Shabanov, A. K., Zinovkina, L. A., Popova, E. N., Aznauryan, M. A., Lanina, N. O., Vitushkina, M. V., Zinovkin, R. A. (2015). Pure mitochondrial DNA does not activate human neutrophils in vitro. *Biochemistry (Moscow)*, 80(5), 629–635.
171. Rieger, A. M., Nelson, K. L., Konowalchuk, J. D., & Barreda, D. R. (2011). Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *Journal of Visualized Experiments*, (50), e2597.
172. Rollet-Labelle, E., Grange, M. J., Elbim, C., Marquetty, C., Gougerot-Pocidallo, M. A., & Pasquier, C. (1998). Hydroxyl radical as a potential intracellular mediator of polymorphonuclear neutrophil apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 24(4), 563–572.
173. Roos, D., van Bruggen, R., & Meischl, C. (2003). Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes and Infection*, 5(14), 1307–1315.
174. Rossi, A. G., Sawatzky, D. A., Walker, A., Ward, C., Sheldrake, T. A., Riley, N. A., ... Haslett, C. (2006). Cyclin-dependent kinase inhibitors enhance the resolution of inflammation by promoting inflammatory cell apoptosis. *Nature Medicine*, 12(9), 1056–1064.
175. Salamone, G., Giordano, M., Trevani, A. S., Gamberale, R., Vermeulen, M., Schettinni, J., & Geffner, J. R. (2001). Promotion of Neutrophil Apoptosis by TNF-. *The Journal of Immunology*, 166(5), 3476–3483.
176. Sanz, M. J., & Kubes, P. (2012). Neutrophil-active chemokines in in vivo imaging of neutrophil trafficking. *European Journal of Immunology*, 42(2), 278–283.
177. Savitskaya, M. A., & Onishchenko, G. E. (2015). Mechanisms of Apoptosis. *Biochemistry. Biokhimiia*, 80(11), 1393–1405.
178. Schmidtke, D. W., & Diamond, S. L. (2000). Direct Observation of Membrane Tethers Formed during Neutrophil Attachment to Platelets or P-selectin under Physiological Flow. *J. Cell Biol.*, 149(3), 719–729.
179. Serrao, K. L., Fortenberry, J. D., Owens, M. L., Harris, F. L., & Brown, L. a. (2001). Neutrophils induce apoptosis of lung epithelial cells via release of soluble Fas ligand. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 280(2), L298–305.

180. Shadel, G. S., & Clayton, D. A. (1997). Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annual Review of Biochemistry*, 66, 409–435.
181. Sheshachalam, A., Srivastava, N., Mitchell, T., Lacy, P., & Eitzen, G. (2014). Granule protein processing and regulated secretion in neutrophils. *Frontiers in Immunology*, 5(SEP), 1–11.
182. Solaroglu, I., Tsubokawa, T., Cahill, J., & Zhang, J. H. (2006). Anti-apoptotic effect of granulocyte-colony stimulating factor after focal cerebral ischemia in the rat. *Neuroscience*, 143(4), 965–974.
183. Squier, M. K. T., Sehnert, A. J., Sellins, K. S., Malkinson, A. M., Takano, E., & Cohen, J. J. (1999). Calpain and calpastatin regulate neutrophil apoptosis. *Journal of Cellular Physiology*, 178(3), 311–319.
184. Sun, S., Sursal, T., Adibnia, Y., Zhao, C., Zheng, Y., Li, H., ... Itagaki, K. (2013). Mitochondrial DAMPs increase endothelial permeability through neutrophil dependent and independent pathways. *PloS One*, 8(3), e59989.
185. Takeda, K., & Akira, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*, 17(1), 1–14.
186. Tamassia, N., Le Moigne, V., Calzetti, F., Donini, M., Gasperini, S., Ear, T., ... Cassatella, M. A. (2007). The MyD88-independent pathway is not mobilized in human neutrophils stimulated via TLR4. *J Immunol*, 178(11), 7344–7356.
187. Tennenberg, S. D., Fey, D. E., & Lieser, M. J. (1993). Oxidative priming of neutrophils by interferon-gamma. *Journal of Leukocyte Biology*, 53(3), 301–308.
188. Thomas, L. W., Lam, C., & Edwards, S. W. (2010). Mcl-1 ; the molecular regulation of protein function. *FEBS Letters*, 584(14), 2981–2989.
189. Toonen, R. F. G., & Verhage, M. (2003). Vesicle trafficking: Pleasure and pain from SM genes. *Trends in Cell Biology*, 13(4), 177–186.
190. Trautmann, A. (2009). Extracellular ATP in the Immune System: More Than Just a “Danger Signal.” *Science Signaling*, 2(56), pe6-pe6.
191. Tsuji, N., Tsuji, T., Ohashi, N., Kato, A., Fujigaki, Y., & Yasuda, H. (2016). Role of Mitochondrial DNA in Septic AKI via Toll-Like Receptor 9. *Journal of the American*

192. Urban, C. F., Ermert, D., Schmid, M., Abu-Abed, U., Goosmann, C., Nacken, W., Brinkmann, V., Jungblut, P. R., Zychlinsky, A. (2009). Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathogens*, 5(10).
193. Urban, C. F., Reichard, U., Brinkmann, V., & Zychlinsky, A. (2006). Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* and hyphal forms. *Cellular Microbiology*, 8(4), 668–676.
194. van den Berg, J. M., Weyer, S., Weening, J. J., Roos, D., & Kuijpers, T. W. (2001). Divergent effects of tumor necrosis factor alpha on apoptosis of human neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*, 69(3), 467–473.
195. van der Linden, M., Westerlaken, G. H. A., van der Vlist, M., van Montfrans, J., & Meyaard, L. (2017). Differential Signalling and Kinetics of Neutrophil Extracellular Trap Release Revealed by Quantitative Live Imaging. *Scientific Reports*, 7(1), 6529.
196. Van Raam, B. J. (2009). Mitochondria in neutrophil apoptosis. *PhD Thesis*.
197. Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., ... Vaux, D. L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, 102(1), 43–53.
198. Vestweber, D. (2007). Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium. *Immunological Reviews*, 218, 178–196.
199. Vorobjeva, N., Prikhodko, A., Galkin, I., Pletjushkina, O., Zinovkin, R., Sud'ina, G., ... Pinegin, B. (2017). Mitochondrial reactive oxygen species are involved in chemoattractant-induced oxidative burst and degranulation of human neutrophils in vitro. *European Journal of Cell Biology*, 96(3), 254–265.
200. Walmsley, S. R., Print, C., Farahi, N., Peyssonnaud, C., Johnson, R. S., Cramer, T., ... Chilvers, E. R. (2005). Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1 α -dependent NF- κ B activity. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(1), 105–115.
201. Wang, Y., Li, M., Stadler, S., Correll, S., Li, P., Wang, D., Hayama, R., Leonelli, L., Han, H., Grigoryev, S. A., Allis, C. D., Coonrod, S. A. (2009). Histone hypercitullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *Journal of*

- Cell Biology*, 184(2), 205–213.
202. Wartha, F., & Henriques-Normark, B. (2008). ETosis: A novel cell death pathway. *Science Signaling*, 1(21), 19–22. <https://doi.org/10.1126/stke.121pe25>
203. Watson, G. W. R., O'Neill, A., Brannigen, A. E., Coffey, R., Marshall, J. C., Brady, H. R., & Fitzpatrick, J. M. (1999). Regulation of Fas antibody induced neutrophil apoptosis is both caspase and mitochondrial dependent. *FEBS Letters*, 453(1–2), 67–71.
204. Watson, R. W. G. (2002). Redox regulation of neutrophil apoptosis. *Antioxidants & Redox Signaling*, 4(1), 97–104.
205. Watson, R. W., Redmond, H. P., Wang, J. H., Condrón, C., & Bouchier-Hayes, D. (1996). Neutrophils undergo apoptosis following ingestion of *Escherichia coli*. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 156(10), 3986–3992. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8621940>
206. Wei, X., Shao, B., He, Z., Ye, T., Luo, M., Sang, Y., Liang, X., Wang, W., Luo S., Yang, S., Zhang, S., Gong, C., Gou, M., Deng, H., Zhao, Y., Yang, H., Deng, S., Zhao, C., Yang, L., Sun, X., Han, J., Jiang, C., Wu, M., Zhang, Z. (2015). Cationic nanocarriers induce cell necrosis through impairment of Na⁺/K⁺-ATPase and cause subsequent inflammatory response. *Cell Research*, 25(2), 237–253.
207. Weinmann, P., Gaetgens, P., & Walzog, B. (1999). Bcl-XL- and Bax- α -Mediated Regulation of Apoptosis of Human Neutrophils Via Caspase-3. *Blood*, 93(9), 3106–3115.
208. Weirich, E., Rabin, R. L., Maldonado, Y., Benitz, W., Modler, S., & Herzenberg, L. A. (1998). Neutrophil CD11b expression as a diagnostic marker for early-onset neonatal infection. *Journal of Pediatrics*, 132(3 I), 445–451.
209. Weniger, M., Reinelt, L., Neumann, J., Holdt, L., Ilmer, M., Renz, B., ... D'Haese, J. G. (2016). The Analgesic Effect of the Mitochondria-Targeted Antioxidant SkQ1 in Pancreatic Inflammation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1–10.
210. Wesche, D. E. (2005). Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock. *Journal of Leukocyte Biology*, 78(2), 325–337.
211. Williams, M. R., Azcutia, V., Newton, G., Alcaide, P., & Luscinskas, F. W. (2011). Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium. *Trends in Immunology*, 32(10),

212. Winterbourn, C. C., Kettle, A. J., & Hampton, M. B. (2016). Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. *Annual Review of Biochemistry*, 85, 765–792.
213. Witko-Sarsat, V., Mocek, J., Bouayad, D., Tamassia, N., Ribeil, J.-A., Candalh, C., Davezac, N., Reuter, N., Mouthon, L., Hermine, O., Pederzoli-Ribeil, M., Cassatella, M. A. (2010). Proliferating cell nuclear antigen acts as a cytoplasmic platform controlling human neutrophil survival. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(12), 2631–2645.
214. Xu, Y., Loison, F., & Luo, H. R. (2010). Neutrophil spontaneous death is mediated by down-regulation of autocrine signaling through GPCR, PI3Kgamma, ROS, and actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(7), 2950–2955.
215. Yamamoto, A., Taniuchi, S., Tsuji, S., Hasui, M., & Kobayashi, Y. (2002). Role of reactive oxygen species in neutrophil apoptosis following ingestion of heat-killed *Staphylococcus aureus*. *Clinical and Experimental Immunology*, 129(3), 479–484. Retrieved from
216. Yamanouchi, S., Kudo, D., Yamada, M., Miyagawa, N., Furukawa, H., & Kushimoto, S. (2013). Plasma mitochondrial DNA levels in patients with trauma and severe sepsis: Time course and the association with clinical status. *Journal of Critical Care*, 28(6), 1027–1031.
217. Yipp, B. G., Petri, B., Salina, D., Jenne, C. N., Scott, B. N. V., Zbytniuk, L. D., ... Kubes, P. (2012). Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nature Medicine*, 18(9), 1386–1393.
218. Yousefi, S., Mihalache, C., Kozlowski, E., Schmid, I., & Simon, H. U. (2009). Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death and Differentiation*, 16(11), 1438–1444.
219. Yuo, A., Kitagawa, S., Suzuki, I., Urabe, A., Okabe, T., Saito, M., & Takaku, F. (1989). Tumor necrosis factor as an activator of human granulocytes. Potentiation of the metabolisms triggered by the Ca²⁺-mobilizing agonists. *J Immunol.*, 142(5), 1678–1684.
220. Zhang, Q., Itagaki, K., & Hauser, C. J. (2010). Mitochondrial DNA is released by shock and activates neutrophils via p38 map kinase. *Shock (Augusta, Ga.)*, 34(1), 55–59.
221. Zhang, Q., Raouf, M., Chen, Y., Sumi, Y., Sursal, T., Junger, W., ... Hauser, C. J. (2010). Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature*, 464(7285), 104–107.

222. Zhu, D., Hattori, H., Jo, H., Jia, Y., Subramanian, K. K., Loison, F., ... Luo, H. R. (2006). Deactivation of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate/Akt signaling mediates neutrophil spontaneous death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(40), 14836–14841.
223. Zong, W. X., Li, C., Hatzivassiliou, G., Lindsten, T., Yu, Q. C., Yuan, J., & Thompson, C. B. (2003). Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *Journal of Cell Biology*, *162*(1), 59–69.
224. Zu, Y. L., Qi, J., Gilchrist, A., Fernandez, G. A., Vazquez-Abad, D., Kreutzer, D. L., ... Sha'afi, R. I. (1998). p38 mitogen-activated protein kinase activation is required for human neutrophil function triggered by TNF-alpha or FMLP stimulation. *J Immunol*, *160*(4), 1982–1989.
225. Zucker-Franklin, D. (1968). Electron microscopic studies of human granulocytes: structural variations related to function. *Seminars in Hematology*, *5*(2), 109–133.
226. Белоусов, В. В., Ениколопов, Г. Н., & Мишина, Н. М. (2012). КОМПАРТМЕНТАЛИЗАЦИЯ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛОВ, ОПОСРЕДОВАННЫХ АКТИВНЫМИ ФОРМАМИ КИСЛОРОДА. *Биоорганическая Химия*, *7*(499), 1–35.