

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 571.27

Участие митоген-активируемых протеинкиназ p38 и ERK1/2, а также протеинкиназы B Akt1/2 в образовании нейтрофильных внеклеточных ловушек

Н.В. Воробьева*

Кафедра иммунологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

*e-mail: nvvorobjeva@mail.ru

Нейтрофилы высвобождают деконденсированный ядерный хроматин или нейтрофильные внеклеточные ловушки (NET, Neutrophil Extracellular Trap) в ответ на большое количество разнообразных физиологических стимулов с целью защиты хозяина от патогенов. Однако как было недавно установлено, NET играют также важную роль в патогенезе аутоиммунных, воспалительных и онкологических заболеваний. В этой связи понимание молекулярных механизмов, лежащих в основе образования NET и ведущих, как правило, к гибели нейтрофилов (NETоз), крайне важно для обеспечения контроля за aberrантным выбросом хроматина. Митоген-активируемые протеинкиназы (МАР-киназы) участвуют в разнообразных функциях клеток, таких как окислительный взрыв, хемотаксис, дегрануляция, адгезия и апоптоз, однако их роль в NETозе исследовалась недостаточно. У нейтрофилов человека описаны три семейства МАР-киназ – p38, ERK1/2 и JNK. В нашей работе было исследовано участие p38, ERK1/2, а также протеинкиназы B Akt1/2 в окислительном взрыве и NETозе с использованием ингибиторного анализа. Мы показали, что МАР-киназа p38 и протеинкиназа B Akt1/2 активируются при стимуляции окислительного взрыва и NETоза кальциевым ионофором иономицином. Вместе с тем эти киназы не принимают участия в окислительном взрыве, индуцированном миметиком диацилглицерола форбол 12-миристанат 13-ацетатом (ФМА), но участвуют в ФМА-индуцированном NETозе.

Ключевые слова: нейтрофилы человека, окислительный взрыв, нейтрофильные внеклеточные ловушки, митоген-активируемые протеинкиназы, протеинкиназа B, НАДФН-оксидаза

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-4-2

Нейтрофилы представляют собой наиболее многочисленную группу лейкоцитов крови человека, обеспечивающих первую линию защиты хозяина от патогенов. Являясь профессиональными фагоцитами, нейтрофилы содержат антимикробные ферменты в гранулах и выполняют такие эффекторные функции, как фагоцитоз, дегрануляция и образование активных форм кислорода (АФК) в очагах воспаления. Новой эффекторной функцией нейтрофилов, впервые исследованной в лаборатории Артуро Циклински [1], является образование нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET, Neutrophil Extracellular Trap). NET состоят из деконденсированного хроматина, покрытого гистонами, антимикробными ферментами и катионными пептидами гранул, а также цитозольными белками. Процесс образования NET, ведущий к программируемой гибели клеток, был назван NETозом [2].

Впоследствии оказалось, что, помимо защитной функции, NET играют важную роль в патогенезе таких аутоиммунных и воспалительных заболеваний, как системная красная волчанка, ревматоидный артрит, васкулит мелких сосудов и псориаз [3–8]. В связи с этим расшифровка сигнальных путей, ведущих к выбросу NET, крайне важна для обеспечения контроля их нерегулируемого или избыточного образования.

Образование NET может быть индуцировано большим количеством разнообразных физиологических стимулов, таких как бактерии, грибы, простейшие, вирусы и продукты клеточной стенки бактерий (липополисахариды) [1]. NET также могут быть индуцированы антителами и иммунными комплексами [9–10], цитокинами и хемокинами (IL-8, TNF- α , IFN- γ) [11], кальциевыми [12–14] и калиевыми [15] ионофорами, а также фармакологическими стимулами – например, форбол

12-миристан 13-ацетатом (ФМА) [12–14]. За последние несколько лет появились сообщения о стимуляции NETоза электромагнитным излучением [16–17].

Классический, или «суицидальный», NETоз представляет собой многостадийный процесс, включающий образование АФК ферментным комплексом НАДФН-оксидазой, диссоциацию под действием пероксида водорода «азуром» — белковых комплексов, расположенных в мембранах азурофильных гранул [18], выход из азуром сериновых протеаз и миелопероксидазы (МПО) в цитоплазму, их последующую миграцию в ядро, где вместе с пептидиларгининдеиминазой 4, цитруллинирующей гистоны, они обеспечивают деконденсацию ядерного хроматина [1]. Итогом перечисленных реакций является выброс хроматина из клетки, или NETоз.

Помимо упомянутых выше ключевых ферментов NETоза в сигнальных путях передачи информации от первичного акцептора сигнала и до образования NET принимает участие большое количество ферментов — например, изоформы протеинкиназы C (PKC, protein kinase C) [14, 19], циклинзависимые киназы 4/6 [20], Raf-MEK-ERK-сигнальный ферментативный каскад [21], нерецепторные тирозинкиназы Src-семейства [22], митоген-активируемые протеинкиназы (MAP-киназы) [21, 23, 24] и протеинкиназа B Akt1/2 [25].

В настоящее время у млекопитающих описаны пять основных семейств MAP-киназ: регулируемые внеклеточными сигналами киназы 1 и 2 (ERK1/2), активируемые стрессом протеинкиназы SAPK/JNK, протеинкиназы p38, ERK3 и ERK5, причем в нейтрофилах человека были обнаружены первые три семейства MAP-киназ. Было показано, что MAP-киназы p38 и ERK1/2 активируются в течение нескольких секунд в ответ на широкий спектр стимулов, включающий бактериальные пептиды, цитокины, липополисахариды и хемотактанты [26]. Участие MAP-киназ p38 и ERK1/2 было подробно изучено в таких регуляторных процессах, как окислительный взрыв, хемотаксис, дегрануляция, адгезия и апоптоз [26], однако их роль в NETозе исследовалась в ограниченном количестве работ [21, 23, 24] и полученные данные носят противоречивый характер.

С использованием ингибиторного анализа было показано [24], что активатор протеинкиназы C, ФМА, стимулирует образование NET с участием p38 и ERK1/2. Однако ингибиторы этих MAP-киназ не подавляли ФМА-стимулированный окислительный взрыв. Это позволило авторам сделать вывод, что экспрессия MAP-киназ p38 и ERK1/2 в NETотическом сигнальном пути происходит после стимуляции НАДФН-оксидазы и регулируется оксидаза-зависимыми АФК. Напротив, Хакким и соавт. [21] обнаружили, что ин-

гибитор киназы ERK1/2 подавляет как окислительный взрыв, так и NETоз, стимулированный ФМА. По мнению авторов, ERK1/2 находится в сигнальном пути образования NET до НАДФН-оксидазы. Участие MAP-киназ в NETозе, индуцированном кальциевыми ионофорами, исследовалось только на линии нейтрофилоподобных клеток человека HL-60 [23]. Целью настоящей работы было изучение роли MAP-киназ p38 и ERK1/2, а также протеинкиназы B Akt1/2 в окислительном взрыве и NETозе полученных от здоровых доноров нейтрофилов, стимулированных ФМА и кальциевым ионофором иономицином.

Материалы и методы

Реагенты. ФМА, иономицин, SB202190 (ингибитор p38), FR180204 (ингибитор ERK1/2), ингибитор киназы Akt1/2 VIII, диметилсульфоксид и люминол были приобретены в компании Sigma-Aldrich (США). Краситель SYBR Green и смола ProLong Gold были закуплены в Thermo Fisher Scientific (Invitrogen, США).

Выделение первичных нейтрофилов человека. Все исследования с кровью проводили в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации 2000 г. и протоколом Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г. Образцы крови были получены с добровольного согласия доноров в отделении переливания крови Российской детской клинической больницы ФГБОУ ВО «Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова» Минздрава России. Периферическую кровь здоровых доноров забирали в утренние часы натощак в полипропиленовые пробирки с гепарином. Нейтрофилы выделяли с помощью центрифугирования в одноступенчатом градиенте плотности Ficoll-Huраque (плотность 1,077 г/см³) в течение 25 мин при 400g и комнатной температуре, как описано ранее [12]. Основную массу эритроцитов удаляли путем седиментации в декстрате. Оставшиеся эритроциты лизировали в гипотоническом растворе хлорида натрия (0,2%-ный NaCl) в течение 30 с и далее восстанавливали изотоничность путем добавления 1,6%-ного NaCl. Нейтрофилы ресуспендировали в полной культуральной среде (PKC), включающей RPMI1640, 10 mM HEPES, 2 mM L-глутамин и 1%-ную инактивированную эмбриональную телячью сыворотку. Полученные клетки были представлены на 97% гранулоцитами, а их жизнеспособность составляла не менее 99%, что определяли по исключению 0,1%-ного трипанового синего.

Оценка люминол-зависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ). ЛЗХЛ использовали для оценки суммарных АФК, как описано ранее [12, 13]. Свежевыделенные нейтрофилы в концентрации ($2,5 \times 10^6$ клеток/мл) инкубировали в присутствии ингибиторов MAP-киназ SB202190 и FR180204,

а также ингибитора Akt1/2 в возрастающих концентрациях в течение 30 мин при 37°C и 5% CO₂ в ПКС. Далее ПКС заменяли на фосфатный буфер Кребса-Рингера (120 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1,7 мМ KH₂PO₄, 8,3 мМ Na₂HPO₄, 10 мМ глюкоза, 1 мМ CaCl₂, 1,5 мМ MgCl₂, pH 7,3). К 2 × 10⁵ клеток добавляли люминол (конечная концентрация 80 мкМ) и проводили стимуляцию окислительного взрыва в присутствии 2,5 мкМ иономицина или 30 нМ ФМА. ЛЗХЛ анализировали сразу после стимуляции в течение 30 мин при 37° С в планшетном хемилюминометре Lucy 1 (Anthos Labtec, Австрия). Оценивали площадь, занимаемую кривыми ЛЗХЛ, и выражали степень окислительного взрыва в процентах от контроля (контроль: стимулированные нейтрофилы, 100%) в виде гистограмм.

Индукция и флуоресцентное окрашивание NET.

Для обнаружения NET использовали флуоресцентную микроскопию. Свежевыделенные нейтрофилы (2 × 10⁵ клеток/мл в 500 мкл ПКС), адгезированные на круглых покровных стеклах, находящихся в лунках 24-луночного планшета, инкубировали с SB202190, FR180204 и ингибитором Akt1/2 в течение 30 мин при 37°C и 5% CO₂. Образование NET индуцировали 30 нМ ФМА или 2,5 мкМ иономицина в течение 2 ч 40 мин и 4 ч соответственно. После стимуляции NETоза клетки фиксировали в лунках в 4%-ном растворе параформальдегида в течение 15 мин. Препараты окрашивали SYBR Green в течение 7 мин при комнатной температуре в темноте, далее погружали в смолу ProLong Gold. Клетки анализировали с использованием флуоресцентного микроскопа Leica DM LB (Leica Microsystems, Германия), а фотографирование проводили с помощью камеры Leica DC300F. Подсчитывали общее количество

клеток и количество NETотических клеток в каждом поле зрения, затем оценивали процент NETоза в нескольких полях зрения.

Статистическая обработка. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы GraphPad InStat 3.06 (GraphPad Software, США). Сравнение между несколькими экспериментальными группами проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA), сопровождаемого тестом множественного сравнения Бонферрони. Данные в тексте и на рисунках представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего пяти независимых экспериментов. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Чтобы выяснить, зависит ли окислительный взрыв нейтрофилов здоровых доноров, активированный ФМА и кальциевым ионофором иономицином, от MAP-киназ p38 и ERK1/2, а также протеинкиназы B Akt1/2, были применены их специфические ингибиторы: SB202190 (ингибитор p38), FR180204 (ингибитор ERK1/2) и ингибитор Akt1/2 (VIII). Окислительный взрыв оценивали с помощью регистрации ЛЗХЛ, как описано в разделе «Материалы и методы».

На рис. 1А можно видеть, что инкубация нейтрофилов с ингибиторами трех киназ в возрастающих концентрациях не приводила к значимому подавлению окислительного взрыва, индуцированного ФМА. Однако ингибиторы p38 и Akt1/2 эффективно и дозозависимым способом подавляли окислительный взрыв, индуцированный иономицином (рис. 1Б), в то время как ингибитор ERK1/2 был неэффективен.

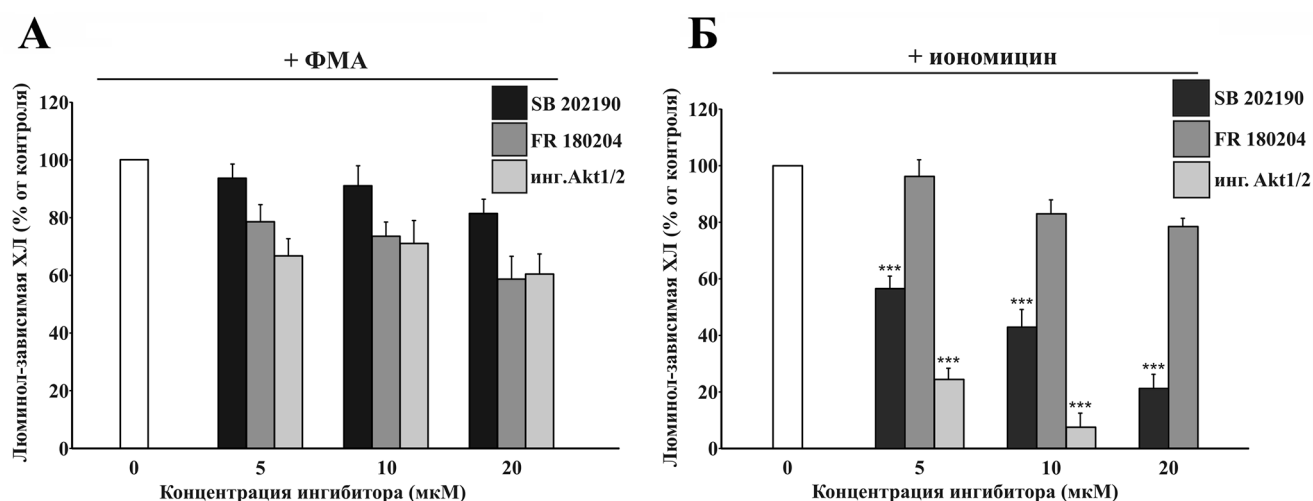


Рис. 1. Оценка участия MAP-киназ p38 и ERK1/2, а также протеинкиназы B Akt1/2 в окислительном взрыве нейтрофилов человека, стимулированном ФМА и иономицином. Нейтрофилы здоровых доноров инкубировали в присутствии ингибиторов MAP-киназ p38 (SB202190) и ERK1/2 (FR180204), а также ингибитора протеинкиназы B Akt1/2 в возрастающих концентрациях в течение 30 мин. Окислительный взрыв индуцировали ФМА (30 нМ) (А) или иономицином (2,5 мкМ) (Б), и регистрировали хемилюминесценцию в присутствии 80 мкМ люминола (80 мкМ). $n = 5$. *** – $p < 0,001$. Сокращения на графиках: ХЛ, хемилюминесценция; инг. Akt1/2, ингибитор киназы Akt1/2 VIII.

Для оценки участия MAP-киназ p38 и ERK1/2, а также протеинкиназы В Akt1/2 в NETозе, индуцированном ФМА и иономицином, нейтрофилы здоровых доноров инкубировали в присутствии соответствующих ингибиторов киназ в возрастающих концентрациях. На рис. 2 (А, В) можно видеть, что все три ингибитора подавляли ФМА-индуцированный NETоз дозозависимым способом. Однако в случае иономицин-индуцированного NETоза, только ингибиторы p38 и Akt1/2 эффективно подавляли образование NET (рис. 2 Б, Г), тогда как ингибитор ERK1/2 такого действия не оказывал. Эти данные коррелируют с действием ингибиторов киназ на иономицин-индуцированный окислительный взрыв.

Таким образом, в нашем исследовании с применением ингибиторного анализа показано, что MAP-киназы p38 и ERK1/2, а также протеинкиназа В Akt1/2 участвуют в NETозе, но не окислительном взрыве, активированном ФМА (рис. 3А). Полученные данные коррелируют с результатами работы

Кешари и соавт. [24], в которой также утверждается, что киназы p38 и ERK1/2 расположены в сигнальном NETотическом пути после НАДФН-оксидазы и активируется при участии оксидаза-зависимых АФК. Однако Хакким и соавт. [21] показали, что ингибитор киназы ERK1/2 (UO126) подавляет как окислительный взрыв, так и NETоз, что не согласуется с нашими результатами и данными Кешари и соавт. Авторы утверждают [21], что киназа ERK1/2 находится в сигнальном пути активации NETоза до НАДФН-оксидазы, а ее подавление ингибирует образование оксидаза-зависимых АФК и, соответственно, NETоза.

Хотя в нашей работе не было продемонстрировано подавление ФМА-стимулированного окислительного взрыва ингибиторами MAP-киназ p38 и ERK1/2, а также протеинкиназы В Akt1/2, мы полагаем, что эти киназы участвуют в стимуляции НАДФН-оксидазы, а их эффект не виден из-за мощной активации РКС ФМА. Однако для доказательства участия этих киназ в окислительном

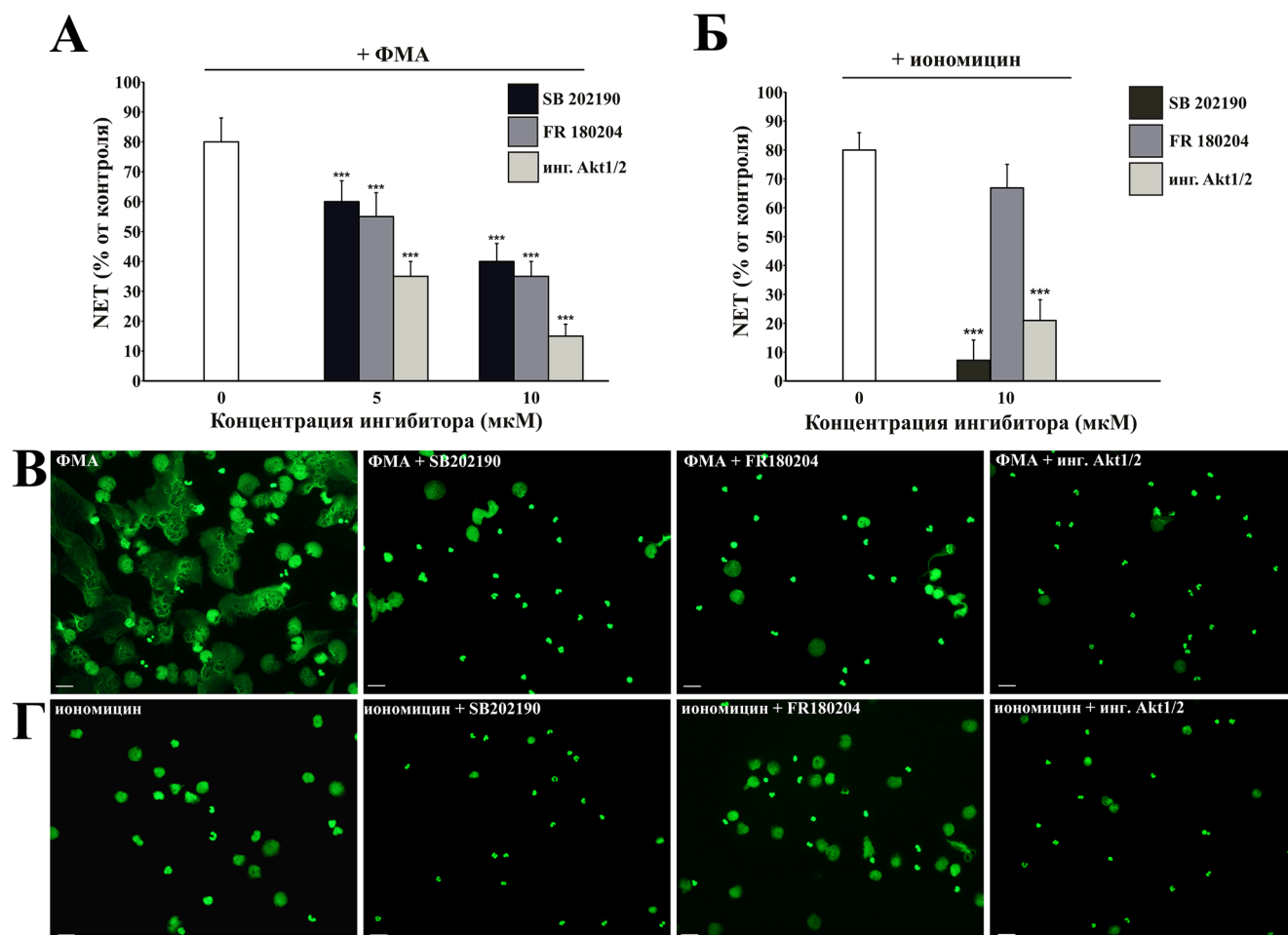


Рис. 2. Оценка участия MAP-киназ p38 и ERK1/2, а также протеинкиназы В Akt1/2 в NETозе, стимулированном ФМА и иономицином. Для оценки NETоза нейтрофилы здоровых доноров, адгезированные на круглых покровных стеклах, инкубировали в присутствии ингибиторов MAP-киназ p38 и ERK1/2, а также киназы Akt1/2 в возрастающих концентрациях в течение 30 мин. NETоз индуцировали ФМА (30 нМ) (А, В) или иономицином (2,5 мкМ) (Б, Г) в течение 2 ч 40 мин и 4 ч соответственно. Клетки фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида и окрашивали SYBR Green для визуализации хроматина. $n = 5$. *** — $p < 0,001$. Концентрации ингибиторов p38, ERK1/2 и Akt1/2 составляют 10 мкМ (Б, Г). Масштаб 25 мкм. Сокращения на графиках: инг. Akt1/2, ингибитор киназы Akt1/2 VIII; NET, нейтрофильные внеклеточные ловушки (от Neutrophil Extracellular Trap).

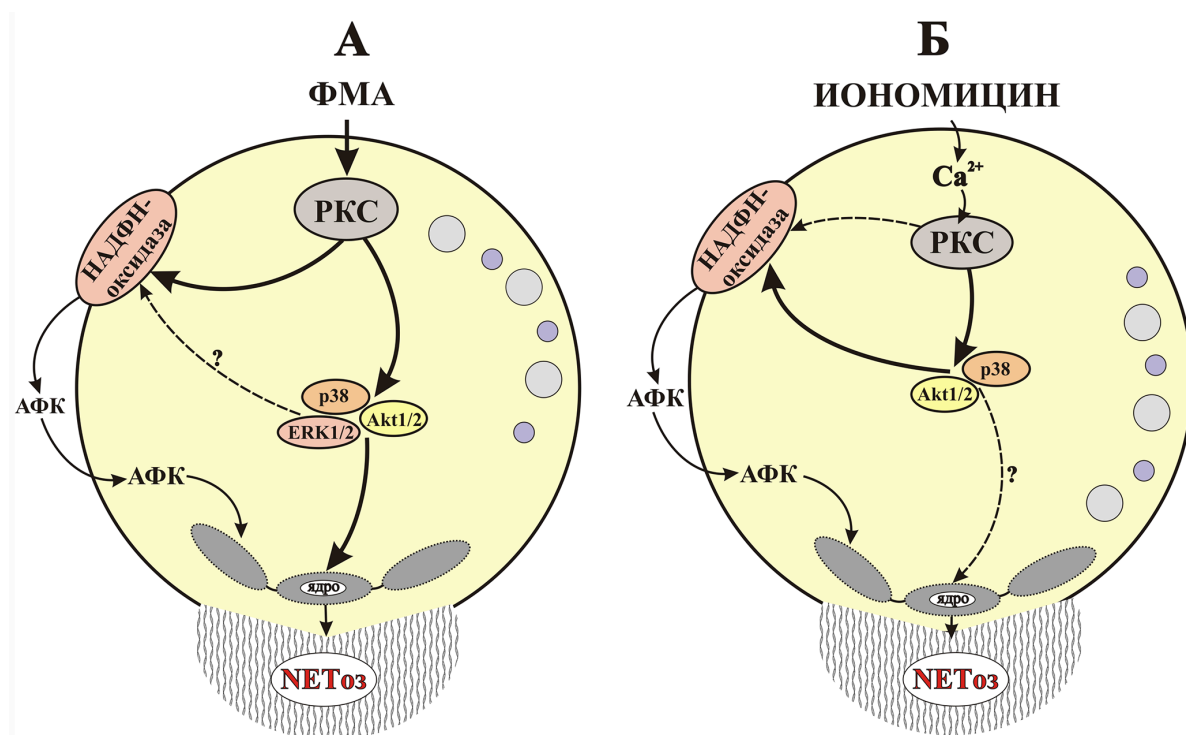


Рис. 3. Схема активации NETоза под действием различных стимулов.

Сокращения: PKC, протеинкиназа C; АФК, активные формы кислорода; ФМА, форбол 12-миристал 13-ацетат; p38, ERK1/2, митоген-активируемые протеинкиназы; Akt1/2, протеинкиназа B.

взрыве может потребоваться использование ингибиторов в более высоких концентрациях. В то же время известно, что ингибиторы этих киназ в дозах выше 20 мкМ могут вызывать неспецифические эффекты. Интересно, что Хакким и соавт. [21] использовали в своей работе ингибитор ERK1/2 в достаточно высокой концентрации – 100 мкМ.

В отличие от ФМА, ионофор кальция иономицин действует более специфично, вызывая высвобождение Ca^{2+} из эндоплазматического ретикула, что активирует PKC и далее p38 и Akt1/2 (рис. 3Б). Подавление этих киназ соответствующими ингибиторами в нашей работе приводило к уменьшению как окислительного взрыва, так и NETоза. Таким образом, МАР-киназа p38 и протеинкиназа B Akt1/2 участвуют в иономицин-индуцированном окислительном взрыве,

влияя на эффективность NETоза. Однако эти киназы также могут быть непосредственно вовлечены в NETоз, что еще предстоит выяснить в наших дальнейших исследованиях.

Работа выполнена в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121042600047-9 и Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология». Исследование было одобрено локальным комитетом по этике Российской детской клинической больницы ФГБОУ ВО «Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова» Минздрава России. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532–1535.
2. Steinberg B.E., Grinstein S. Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death. *Sci. STKE*. 2007;2007(379):e11.
3. Pinegin B., Vorobjeva N., Pinegin V. Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 2015;14(7):633–640.
4. Vorobjeva N.V., Pinegin B.V. Neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation and role in health and disease. *Biochemistry (Mosc.)*. 2014;79(12):1286–1296.
5. Vorobjeva N.V., Chernyak B.V. NETosis: molecular mechanisms, role in physiology and pathology. *Biochemistry (Mosc.)*. 2020;85(10):1178–1190.
6. Vorobjeva N.V. Neutrophil extracellular traps: new aspects. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2020;75(4):173–188.
7. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2018;18(2):134–147.

8. Свистушкин В.М., Никифорова Г.Н., Воробьева Н.В., Деханов А.С., Дагиль Ю.А., Бредова О.Ю., Еремеева К.В. Нейтрофильные внеклеточные ловушки в патогенезе хронического риносинусита. *Вестн. оторинол.* 2021;86(6):105–112.
9. Chen K., Nishi H., Travers R., Tsuboi N., Martinod K., Wagner D.D., Stan R., Croce K., Mayadas T.N. Endocytosis of soluble immune complexes leads to their clearance by FcγRIIIB but induces neutrophil extracellular traps via FcγRIIA *in vivo*. *Blood*. 2012;120(22):4421–4431.
10. Behnen M., Leschczyk C., Möller S., Batel T., Klinger M., Solbach W., Laskay T. Immobilized immune complexes induce neutrophil extracellular trap release by human neutrophil granulocytes via FcγRIIIB and Mac-1. *J. Immunol.* 2014;193(4):1954–1965.
11. Keshari R.S., Jyoti A., Dubey M., Kothari N., Kohli M., Bogra J., Barthwal M.K., Dikshit M. Cytokines induced neutrophil extracellular traps formation: implication for the inflammatory disease condition. *PLoS One*. 2012;7(10):e48111.
12. Vorobjeva N., Prikhodko A., Galkin I., Pletjushkina O., Zinovkin R., Sud'ina G., Chernyak B., Pinegin B. Mitochondrial reactive oxygen species are involved in chemoattractant-induced oxidative burst and degranulation of human neutrophils *in vitro*. *Eur. J. Cell. Biol.* 2017;96(3):254–265.
13. Vorobjeva N., Galkin I., Pletjushkina O., Golyshchev S., Zinovkin R., Prikhodko A., Pinegin V., Kondratenko I., Pinegin B., Chernyak B. Mitochondrial permeability transition pore is involved in oxidative burst and NETosis of human neutrophils. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2020;1866(5):165664.
14. Vorobjeva N., Dagil Y., Pashenkov M., Pinegin B., Chernyak B. Protein kinase C isoforms mediate the formation of neutrophil extracellular traps. *Int. Immunopharmacol.* 2022;24(114): 109448.
15. Kenny E.F., Herzig A., Krüger R., Muth A., Mondal S., Thompson P.R., Brinkmann V., Bernuth H.V., Zychlinsky A. Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *Elife*. 2017;6:e24437.
16. Neubert E., Bach K.M., Busse J., Bogeski I., Schön M.P., Kruss S., Erpenbeck L. Blue and Long-Wave Ultraviolet Light Induce *in vitro* Neutrophil Extracellular Trap (NET) Formation. *Front. Immunol.* 2019;10:2428.
17. Arzumanyan G., Mamatkulov K., Arynbeke Y., Zakrytnaya D., Jevremović A., Vorobjeva N. Radiation from UV-A to red light induces ROS-dependent release of neutrophil extracellular traps. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24(6):5770.
18. Metzler K.D., Goosmann C., Lubojemska A., Zychlinsky A., Papayannopoulos V. A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. *Cell. Rep.* 2014;8(3):883–896.
19. Vorobjeva N.V., Vakhlyarskaya S.S., Chernyak B.V. The role of protein kinase C isoforms in the formation of neutrophil extracellular traps. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2022;77(2):112–121.
20. Amulic B., Knackstedt S.L., Abu Abed U., Deigendesch N., Harbort C.J., Caffrey B.E., Brinkmann V., Heppner F.L., Hinds P.W., Zychlinsky A. Cell-cycle proteins control production of neutrophil extracellular traps. *Dev. Cell.* 2017;43(4):449–462.e5.
21. Hakkim A., Fuchs T.A., Martinez N.E., Hess S., Prinz H., Zychlinsky A., Waldmann H. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nat. Chem. Biol.* 2011;7(2):75–77.
22. Vorobjeva N.V. Participation of non-receptor Src-family tyrosine kinases in the formation of neutrophil extracellular traps. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2023;78(1):8–13.
23. Douda D.N., Khan M.A., Grasemann H., Palaniyar N. SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2015;112(9):2817–2822.
24. Keshari R.S., Verma A., Barthwal M.K., Dikshit M. Reactive oxygen species-induced activation of ERK and p38 MAPK mediates PMA-induced NETs release from human neutrophils. *J. Cell. Biochem.* 2013;114(3):532–540.
25. Douda D.N., Yip L., Khan M.A., Grasemann H., Palaniyar N. Akt is essential to induce NADPH-dependent NETosis and to switch the neutrophil death to apoptosis. *Blood*. 2014;123(4):597–600.
26. Ono K., Han J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell. Signal.* 2000;12(1):1–13.

Поступила в редакцию 08.09.2023

После доработки 10.11.2023

Принята в печать 11.12.2023

RESEARCH ARTICLE

Involvement of mitogen-activated protein kinases p38 and ERK1/2 as well as protein kinase B Akt1/2 in the formation of neutrophil extracellular traps

N.V. Vorobjeva* *Department of Immunology, Biology Faculty, Lomonosov Moscow State University, 119234, Moscow, Russia***e-mail: nvvorobjeva@mail.ru*

Neutrophils release decondensed nuclear chromatin or Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in response to a great number of physiological stimuli to protect the host from pathogens. However, NETs have recently been shown to play an important role in the pathogenesis of autoimmune, inflammatory, and malignant diseases. Therefore, understanding the molecular mechanisms underlying NETs formation, usually leading to the neutrophil death (NETosis), is

extremely important to control the aberrant release of chromatin. Mitogen-activated protein kinases (MAP-kinases) are involved in various cellular functions such as oxidative burst, chemotaxis, degranulation, adhesion, and apoptosis, but their role in NETosis is not well understood. Three families of MAP-kinases, p38, ERK1/2, and JNK, have been described in human neutrophils, and we investigated the contribution of p38, ERK1/2, and protein kinase B Akt1/2 in oxidative burst and NETosis using inhibitory analysis. We have shown that MAP-kinase p38 as well as protein kinase B Akt1/2 are activated upon stimulation of oxidative burst and NETosis with calcium ionophore ionomycin. However, these kinases are not involved in the oxidative burst induced by diacylglycerol mimetic phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) but are involved in PMA-induced NETosis.

Keywords: *human neutrophils, oxidative burst, neutrophil extracellular traps, mitogen-activated protein kinases, protein kinase B, NADPH oxidase*

Funding: The research was carried out within the framework of the Scientific Project of the State Order of the Government of Russian Federation to Lomonosov Moscow State University No 121042600047-9 and Interdisciplinary Scientific and Educational School of Moscow University “Molecular Technologies of the Living Systems and Synthetic Biology.”

Сведения об авторе

Воробьева Нина Викторовна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры иммунологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-46-46; e-mail: nvvorobjeva@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5233-9338>