© Коллектив авторов, 2020

Воробьева Н.В.¹, Кондратенко И.В.², Вахлярская С.С.², Черняк Б.В.³,
Пинегин Б.В.⁴

Роль митохондриальной поры в эффекторных функциях нейтрофилов человека

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», 119991, г. Москва, Российская Федерация

² Обособленное структурное подразделение Российской детской клинической больницы Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 119571, г. Москва, Российская Федерация

³ Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», 119991, г. Москва, Российская Федерация

⁴ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, 115522, г. Москва, Российская Федерация

Резюме

Введение. Нейтрофилы образуют нейтрофильные внеклеточные ловушки (NET – Neutrophil Extracellular Traps) – средство борьбы с различными патогенами в очаге воспаления. Однако избыточное образование NET или снижение способности их устранения становятся причиной развития многих аутоиммунных и воспалительных заболеваний. Индукция NET после распознавания патогена специфическими рецепторами ведет к повышению концентрации внутриклеточного Ca^{2+} . В связи с этим применение кальциевого ионофора A23187 можно рассматривать как полуфизиологическую модель образования NET. Известно, что индукция NET различными стимулами зависит от образования активных форм кислорода (АФК) NADPH-оксидазой. Однако образование NET, индуцированное кальциевыми ионофорами, происходит с участием митохондриальных АФК (мтАФК) или без АФК вообще.

Материал и методы. В работе был применен широкий ингибиторный анализ, окислительный взрыв оценивали с помощью регистрации люминол-зависимой хемилюминесценции, а образование NET – методом флуоресцентной микроскопии.

Результаты. С использованием митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 было показано, что мтАФК участвуют в образовании NET и окислительном взрыве, индуцированных A23187, но не активатором протеинкиназы C ФМА. Используя специфические ингибиторы NADPH-оксидазы, мы показали, что АФК, образованные этим ферментом, также участвуют в A23187-индуцированном NETозе. Применив специфические ингибиторы регуляторных компонентов митохондриальной поры (mPTP), мы впервые показали, что mPTP участвует в передаче сигнала от митохондрий к NADPH-оксидазе, в образовании мтАФК, NETозе и окислительном взрыве, индуцированных A23187.

Заключение. На модели NETоза и окислительного взрыва нейтрофилов человека нами было впервые показано, что повышение Ca^{2+} индуцирует взаимодействие двух источников образования АФК, NADPH-оксидазы и митохондрий, а мтАФК регулируют NETоз либо непосредственно, либо путем стимуляции ферментного комплекса. Один из механизмов образования мтАФК, опосредованного повышением концентрации Ca^{2+} , может быть связан с открытием mPTP, представляющей собой многокомпонентный белковый комплекс, расположенный в мембране митохондрий. Избыточное образование NET или снижение способности организма к их устранению могут стать причиной развития аутоиммунных заболеваний. NET также участвуют в развитии легочных заболеваний. В связи с этим понимание сигнальных путей образования NET является чрезвычайно важной задачей для поиска средств борьбы с этими недугами.

Ключевые слова: нейтрофилы человека; окислительный взрыв; активные формы кислорода; нейтрофильные внеклеточные ловушки; митохондриальная пора; mPTP

Для корреспонденции
Воробьева Нина Викторовна –
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
кафедры иммунологии
биологического факультета
ФГБОУ ВО
МГУ имени М.В. Ломоносова,
Москва, Российская Федерация E-mail:
nvvorobjeva@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5233-9338>

Статья поступила 10.11.2019. Принята в печать 16.12.2019.

Для цитирования: Воробьева Н.В., Кондратенко И.В., Вахлярская С.С., Черняк Б.В., Пинегин Б.В. Роль митохондриальной поры в эффекторных функциях нейтрофилов человека. Иммунология. 2020; 41 (1): 42–53. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-1-42-53

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Vorobjeva N.V.¹, Kondratenko I.V.², Vakhlyarskaya S.S.², Chernyak B.V.³,
Pinegin B.V.⁴

The role of the mitochondrial pore in the effector functions of human neutrophils

¹ Lomonosov Moscow State University, 119991, Moscow, Russian Federation

² Russian Children's Clinical Hospital of the Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU) of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 119991, Moscow, Russian Federation

³ A.N. Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991, Moscow, Russian Federation

⁴ National Research Center Institute of Immunology of the Federal Medical-Biological Agency, 115522, Moscow, Russian Federation

Abstract

Introduction. Neutrophils release neutrophil extracellular traps (NETs) in response to numerous pathogenic microbes in the inflammatory foci. However, excessive NETosis or diminished NET clearance is engaged in the pathogenesis of numerous autoimmune and inflammatory disorders. The initiation of NETosis after recognition of pathogens by specific receptors is mediated by an increase in the intracellular Ca^{2+} concentration, therefore, the use of Ca^{2+} ionophore A23187 can be considered as semi-physiological model of NETosis. Induction of NETosis by various stimuli depends on reactive oxygen species (ROS) produced by enzymatic complex NADPH oxidase, however, NETosis induced by Ca^{2+} ionophores was suggested to be mediated by ROS produced in mitochondria (mtROS) or without any ROS in general.

Material and methods. A wide inhibitor analysis has been used in our work, as well as luminol-amplified chemiluminescence assay and fluorescence detection of neutrophil extracellular traps.

Results. Using mitochondria-targeted antioxidant SkQ1, we confirmed that mtROS are involved in the oxidative burst and NET formation activated by A23187, but not a powerful activator of protein kinase C PMA. At the same time, using specific inhibitors of NADPH oxidase, we showed that ROS produced by this enzymatic complex are also involved in NETosis induced by A23187. Application of specific inhibitors of mitochondrial pore (mPTP), allowed us to demonstrate for the first time that mPTP is involved in signal transduction from mitochondria to NADPH oxidase, in mtROS production, NETosis and the oxidative burst induced by A23187.

Conclusion. We assume that the interplay between two sources of ROS, NADPH oxidase and mitochondria, is triggered by Ca^{2+} influx, so that mtROS contribute to NETosis either directly or by stimulating NADPH oxidase. One of the possible physiological mechanisms mediating Ca^{2+} -dependent increase in mtROS production may be associated with the opening of the mitochondrial permeability transition pore mPTP, a multicomponent protein complex located in the mitochondrial membrane. Excessive NETs formation or a decrease in the organism's ability to eliminate them can cause the development of autoimmune diseases. NETs are also involved in the development of lung diseases. Therefore, understanding the signaling pathways of NET formation is extremely important for finding ways to combat these diseases.

Keywords: human neutrophils; oxidative burst; reactive oxygen species; neutrophil extracellular traps; mitochondrial permeability transition pore; mPTP

For correspondence

Nina V. Vorobjeva – PhD,
Senior Researcher,
Department of Immunology,
Faculty of Biology,
Lomonosov Moscow State University,
Moscow,
Russian Federation
E-mail: nvvorobjeva@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5233-9338>

Received 10.11.2019. Accepted 16.12.2019.

For citation: Vorobjeva N.V., Kondratenko I.V., Vakhlyarskaya S.S., Chernyak B.V., Pinegin B.V. The role of the mitochondrial pore in the effector functions of human neutrophils. *Immunologiya*. 2019; 41 (1): 42–53. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-1-42-53 (in Russian)

Funding. The study had no sponsor support.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

Введение

Нейтрофилы представляют собой наиболее многочисленные лейкоциты крови и являются «первой линией защиты» от патогенов в очаге воспаления. Нейтрофилы, будучи «профессиональными» фагоцитами, содержат в своих гранулах огромный антимикробный арсенал, позволяющий вместе с активными формами кислорода уничтожать патогены внутри фагосомы. Антимикробные белки также могут выбрасываться из клеток в процессе дегрануляции. Наконец, существует третий защитный механизм, который был впервые описан в работе Н. Takei и соавт. [1] и исследован на молекулярном уровне в лаборатории А. Zychlinsky [2]. Этот механизм заключается в высвобождении нейтрофильных внеклеточных ловушек, или NET (NETs, Neutrophil Extracellular Traps), состоящих из модифицированного хроматина, «декорированного» белками гранул, ядра и цитоплазмы [3]. Выброс нейтрофильных ловушек, как правило, сопровождается гибелью нейтрофила, а сам процесс называется НЕТозом (NETosis) [4]. НЕТоз представляет собой многоступенчатый последовательно развивающийся процесс, при котором происходит образование активных форм кислорода (АФК) с участием NADPH-оксидазы и транслокация ферментов азурофильных гранул нейтрофильной эластазы (НЭ) и миелопероксидазы (МПО) в ядро. В ядре совместно с пептидил-аргинин-деаминазой 4 (PAD4), цитруллинирующей гистоны, НЭ и МПО осуществляют деконденсацию хроматина, что приводит к его последующему выбросу за пределы клетки или, НЕТозу [5–7].

Образование NET может активироваться различными физиологическими стимулами, например, бактериями, грибами, простейшими, вирусами и компонентами бактериальной клеточной стенки (липополисахарид). NET могут индуцировать антитела и иммунные комплексы [8, 9], цитокины и хемокины (ИЛ-8, ФНО- α) [2, 10], холестерин [11], а также такие фармакологические стимулы, как ФМА, кальциевые и калиевые ионофоры.

Хотя большинство стимулов инициирует НЕТоз, происходящий с участием NADPH-оксидазы (NOX2), основного источника АФК в нейтрофилах, кальциевые ионофоры A23187 и иономицин, а также калиевый ионофор нигерицин активируют оксидаза-независимый НЕТоз. Механизм оксидаза-независимого НЕТоза на сегодняшний день расшифрован не полностью. В ряде публикаций было показано, что он происходит с участием митохондриальных АФК (мтАФК) [12, 13] или без АФК вообще [14].

Взаимодействие различных источников АФК может играть важную роль в активации и регуляции сигнальных путей клеток. Впервые активация NADPH-оксидазы митохондриальными АФК была продемонстрирована в лаборатории С.И. Дикалова [15, 16] на клетках эндотелия сосудов грызунов. С применением митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 мы впервые показали участие мтАФК в рецепторной активации NOX2 нейтрофилов человека на модели fMLP-индуцированного окислительного взрыва и дегрануляции [17].

Процессы, происходящие в митохондриях при образовании мтАФК, изучены недостаточно. Один из возможных механизмов может быть связан с проницаемостью митохондрий, которая индуцируется избыточным содержанием Ca^{2+} . Процесс был описан в работах D.R. Hunter и R.A. Haworth в 1970-е годы [18–20]. Интенсивное изучение этого феномена показало, что внезапное усиление проницаемости внутренней мембраны митохондрий для молекул с молекулярной массой менее 1500 Да связано с обратимым открытием огромной неспецифической митохондриальной поры (mPTP) [21]. Было показано, что чувствительность mPTP к Ca^{2+} усиливается при повышении концентрации фосфата, истощении пула адениновых нуклеотидов, деполяризации мембраны и окислительном стрессе [22, 23]. Открытие mPTP является мощным стимулом образования мтАФК, а окислительный стресс, в свою очередь, усиливает открытие mPTP. Такой замкнутый круг лежит в основе хорошо описанного феномена, называемого «АФК-индуцированное образование АФК» [24].

Хотя точный белковый состав mPTP до конца не расшифрован, было показано, что в этот комплекс входят такие компоненты, как F_0F_1 АТФ-синтаза [21, 25], транслоказа адениновых нуклеотидов (ANT) и циклофиллин D (CypD), обладающий свойствами матриксной пептидил-пролил-*цис-транс*-изомеразы [21, 22, 25, 26].

Ранее было показано, что открытие mPTP способствует быстрому выходу Ca^{2+} и мтАФК из митохондрий [21]. Однако функциональная роль этого процесса не была определена. В представленной работе мы впервые показали, что два источника образования АФК – митохондрии и NADPH-оксидаза участвуют в НЕТозе и окислительном взрыве нейтрофилов человека, индуцированных кальциевым ионофором A23187. Кроме того, впервые было показано, что открытие mPTP приводит к образованию мтАФК, НЕТозу и окислительному взрыву при их индукции A23187.

Материал и методы

Реагенты. В работе был использован митохондриально-направленный антиоксидант SkQ1 (10-(6'-метилпластохинонил)-децилтрифенилфосфониум) и его аналог без антиоксидантной группы, C_{12} TPP (додецилтрифенилфосфониум; отрицательный контроль). Эти вещества были синтезированы в Институте физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского. Апоцинин, VAS2870, DPI (дифенилениодоний), ФМА, A23187, циклоспорин А (CsA), люминол, диметилсульфоксид (ДМСО) были закуплены в Sigma-Aldrich (США); бонгкрековая кислота (БКА) – в Calbiochem Immunochemicals (США); аналог CsA, *N*-methyl-Valyl-4-cyclosporin A (MeVal4CsA) и санглиферин А (SfA) – в Novartis Pharma (Швейцария); SYBR Green, смола ProLong Gold – в Thermo Fisher Sci. (Invitrogen, США).

Выделение первичных нейтрофилов человека. Периферическую кровь здоровых доноров или пациентов с хронической гранулематозной болезнью (ХГБ) забирали в утренние часы натощак в полипропиленовые пробирки с гепарином (20 МЕ/мл крови). Образцы крови пациентов с ХГБ были получены в процессе их планового обследования в Отделении клинической иммунологии и ревматологии РДКБ ФГБОУ «РНМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России. Образцы крови доноров были получены с их добровольного согласия в отделении переливания крови РДКБ. Исследования проводили согласно Хельсинкской декларации ВМА 2000 г. и протокола Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г. Исследование было одобрено локальным комитетом по этике. Нейтрофилы выделяли с помощью центрифугирования в одноступенчатом градиенте плотности Ficoll-Нураке (плотность 1,077 г/см³) в течение 25 мин при 400g и комнатной температуре, как описано ранее [17]. Основную массу эритроцитов удаляли путем седиментации в декстране. Оставшиеся эритроциты лизировали в холодном гипотоническом растворе хлорида натрия (0,2 % NaCl) в течение 30 сек и далее восстанавливали физиологический солевой состав путем добавления гипертонического хлорида натрия (1,6 % NaCl). Нейтрофилы ресуспендировали в полной культуральной среде (ПКС), включающей RPMI 1640 с добавлением 10 мМ HEPES, 2 мМ L-глутамин и 1 % инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (FCS). Полученные клетки были представлены на 98 % гранулоцитами, а их жизнеспособность превышала 99 %, что определяли по исключению 0,1 % трипанового синего. Нейтрофилы инкубировали в течение 1 ч при 4 °C перед экспериментом.

Оценка люминол-зависимой хемилюминесценции. Люминол-зависимую хемилюминесценцию (ХЛ) использовали для оценки суммарных АФК (внутри- и внеклеточных), как описано ранее [27]. Свежевыделенные нейтрофилы в концентрации $2,5 \times 10^6$ кл/мл ($4,5 \times 10^5$ клеток) инкубировали в присутствии SkQ1 или одного из ингибиторов NADPH-оксидазы/mPTP в течение 1 ч или 30 мин соответственно в условиях

37 °C и 5 % CO₂ в ПКС (5 % FCS). 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 2×10^5 клеток добавляли 80 мкМ люминола и стимулировали окислительный взрыв 2 мкМ A23187, 30 нМ ФМА или 800 нМ fMLP. Люминол-зависимую ХЛ анализировали сразу после стимуляции в течение 30 мин при 37 °C в планшетном хемилюминесцентном Lucy 1 (Anthos Labtec, Австрия). Оценивали площадь, занимаемую кривыми ХЛ, и выражали степень окислительного взрыва в процентах от контроля (контроль, стимулированные нейтрофилы; 100 %) в виде гистограмм.

Индукция и флуоресцентное окрашивание NET. Для обнаружения NET использовали флуоресцентную микроскопию. Для этого свежевыделенные нейтрофилы (2×10^5 кл/мл) в ПКС (1 % FCS) адгезировали на круглых покровных стеклах, находящихся в 24-луночном планшете в объеме 500 мкл, в течение 30 мин при 37 °C. Нейтрофилы инкубировали в лунках с SkQ1 или с одним из ингибиторов NADPH-оксидазы/mPTP в течение 1 ч или 30 мин соответственно при 37 °C и 5 % CO₂. Образование NET индуцировали инкубацией с 30 нМ ФМА или 2 мкМ A23187 в течение 2 ч 40 мин и 4 ч соответственно. Препараты без добавления стимуляторов служили контролем. После стимуляции NETоза клетки фиксировали в лунках в растворе 4 % параформальдегида в течение 15 мин при комнатной температуре. Препараты окрашивали SYBR Green в темноте. После промывания дистиллированной водой препараты погружали в смолу ProLong Gold и анализировали клетки с использованием флуоресцентного микроскопа Leica DM LB (Leica Microsystems, Германия). Клетки фотографировали с помощью камеры Leica DC300F. Подсчитывали общее количество клеток и количество нетотических клеток в каждом поле зрения и оценивали процент NETоза в нескольких полях зрения. Для каждого ингибитора было поставлено не менее 3 экспериментов с 3 различными образцами крови, а для каждой концентрации ингибитора анализировали не менее 500 нейтрофилов.

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

Результаты

Митохондриальные АФК участвуют в окислительном взрыве и NETозе, активированными кальциевым ионофором A23187

Для доказательства участия мтАФК в окислительном взрыве был использован митохондриально-направленный антиоксидант SkQ1. С помощью оценки люминол-зависимой ХЛ было показано дозозависимое

Рис. 1. Оценка образования суммарных АФК нейтрофилами здоровых доноров

Нейтрофилы здоровых доноров инкубировали в течение 1 ч в присутствии митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 (контроль, C₁₂TPP) (А, Б), а также специфических ингибиторов NADPH-оксидазы, апоцинина, VAS2870 и неспецифического ингибитора флаavin-содержащих оксидоредуктаз DPI (В, Г) в течение 30 мин. Далее стимулировали окислительный взрыв кальциевым ионофором A23187 или ФМА в присутствии 80 мкМ люминола. Данные представлены в виде $M \pm SEM$ ($n = 5$). * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

подавление окислительного взрыва нейтрофилов здоровых доноров, активированных A23187, но не ФМА (рис. 1А, Б). Аналог SkQ1 без антиоксидантной группы липофильный катион C₁₂TPP не подавлял ни A23187-, ни ФМА-индуцированную ХЛ во всем диапазоне исследованных концентраций (см. рис. 1А, Б).

Мы также показали, что оксидаза-зависимые АФК принимают участие в A23187-индуцированном окислительном взрыве. Для этого нейтрофилы предварительно инкубировали с такими специфическими ингибиторами оксидазы, как апоцинин и VAS2870, а также с неспецифическим ингибитором флаavin-содержащих оксидоредуктаз, DPI. Окислительный взрыв стимулировали A23187 или ФМА. Описано дозозависимое подавление окислительного взрыва, индуцированное обоими стимулами, обратно пропорциональное концентрации ингибиторов (рис. 1В, Г).

Было сделано предположение, что по аналогии с окислительным взрывом НЕТоз, индуцированный Ca²⁺-ионофором, также может происходить с участием как мтАФК, так и NOX2-зависимых АФК в случае ней-

трофилов здоровых доноров. Обнаружено, что митохондриально-направленный антиоксидант SkQ1 дозозависимо ингибировал A23187-индуцированный НЕТоз и не оказывал подобного действия на НЕТоз, активированный ФМА (рис. 2А, Д). Аналог SkQ1, C₁₂TPP, не подавлял НЕТоз, индуцированный обоими стимулами, во всем диапазоне исследованных концентраций (не показано).

Полученные результаты были подтверждены при исследовании нейтрофилов, выделенных из крови пациентов с ХГБ. Диагноз ХГБ у всех пациентов был поставлен на основании абсолютного отсутствия у них окислительного взрыва, что определяли методом регистрации хемилюминесценции (ФГБУ «ГНИЦ Институт иммунологии» ФМБА России), а также генетического подтверждения методом секвенирования по Сэнгеру (ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России). Все пациенты с ХГБ имели одну из мутаций в гене *CYBB*, кодирующем субъединицу gp91phox (X-сцепленная ХГБ).

Рис. 2. Действие митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 и ингибиторов NADPH-оксидазы на A23187-индуцированный НЕТоз

Свежесыведенные нейтрофилы, адгезированные на покровных стеклах, предварительно инкубировали с SkQ1 (А, Б), апоинином (В), VAS2870 и DPI (Г). НЕТоз индуцировали A23187 или ФМА и анализировали, как указано в разделе «Материал и методы». Данные представлены в виде $M \pm SEM$ ($n = 3$). *** – $p < 0,001$. (Д) Слева – нейтрофилы донора, преинкубированные с SkQ1 (200 нМ) и стимулированные ФМА или A23187; справа – нейтрофилы ХГБ, преинкубированные с SkQ1 (200 нМ) и стимулированные ФМА или A23187. Масштаб 25 мкм. $\times 20$.

В нашем исследовании обнаружено, что у всех обследованных пациентов с ХГБ нейтрофилы не образовывали АФК в ответ на стимуляцию ФМА или A23187 (не показано) [28]. Кроме того, нейтрофилы всех обследованных пациентов с ХГБ не образовывали NET в ответ на ФМА (рис. 2Д). Таким образом, мы подтвердили, что нейтрофилы всех обследованных пациентов с ХГБ были полностью дефицитными по NADPH-оксидазе. Вместе с тем, ионофор A23187 индуцировал НЕТоз через 4 ч (рис. 2Б, Д). Предварительная инкубация нейтрофилов, полученных от пациентов с ХГБ, с SkQ1 в течение 1 ч приводила к 70 % подавлению A23187-индуцированного НЕТоза (рис. 2Б, Д). Преинкубация нейтрофилов здоровых доноров со специфическими ингибиторами NADPH-оксидазы, апоцинином, VAS2870, и неспецифическим ингибитором флавин-содержащих ферментов DPI приводила к дозозависимому подавлению НЕТоза, индуцированному обоими стимулами (см. рис. 2В, Г). Инкубация нейтрофилов, выделенных из крови пациентов с ХГБ, с апоцинином, VAS2870 и DPI не вызывала подавления ионофор-индуцированного НЕТоза (не показано).

Таким образом, результаты, полученные на нейтрофилах здоровых доноров, свидетельствуют, что НЕТоз, индуцированный Ca^{2+} -ионофорами, происходит с участием как мТАФК, так и NOX2-зависимых АФК. Вместе с тем у нейтрофилов пациентов с ХГБ НЕТоз, индуцированный Ca^{2+} -ионофорами, происходит только с участием мТАФК. Мы предполагаем, что в нейтрофилах пациентов с ХГБ мТАФК образуются в больших количествах как компенсаторный механизм и их достаточно для осуществления НЕТоза. В случае активации таких нейтрофилов ФМА мТАФК образуются в недостаточном количестве, чтобы запустить НЕТоз. Эта гипотеза подтверждается данными работы, где было показано повышенное образование мТАФК в нейтрофилах пациентов с ХГБ [29]. Однако этот факт, видимо, требует дополнительного исследования.

mPTR участвует в окислительном взрыве и НЕТозе

Учитывая участие мТАФК и оксидазных АФК в окислительном взрыве и НЕТозе нейтрофилов здоровых доноров, индуцированном Ca^{2+} -ионофором, мы предположили, что мТАФК могут регулировать функциональную активность NADPH-оксидазы по принципу обратной связи. Одним из медиаторов этого сигнального пути могла бы быть mPTR. Пора представляет собой многокомпонентный белковый комплекс, расположенный как во внешней, так и во внутренней мембранах митохондрий, и включает такие ферменты, как гексокиназа, креатинкиназа, CypD, а также ANT и анионный канал, зависящий от напряжения (VDAC). Основными белками, от которых зависит активация или блокировка поры, являются CypD и ANT. Таким образом, чтобы доказать участие mPTR в передаче сигнала, мы использовали ее ингибиторы – CsA, аналог CsA MeVal4CsA, SfA и бонгкреговую кислоту (БКА).

CsA является наиболее сильным ингибитором mPTR – блокатором пептидил-пролил-цис-транс-изомеразной

активности CypD, необходимой для взаимодействия с белком ANT и открытию поры [30]. Используя оценку люминол-зависимой ХЛ, мы показали, что CsA дозозависимо блокировал окислительный взрыв нейтрофилов здоровых доноров, стимулированных A23187 (рис. 3А). В аналогичных условиях стимуляция нейтрофилов ФМА после их предварительной инкубации с CsA никак не изменялась (см. рис. 3А).

Вместе с тем известно, что CsA, помимо способности ингибировать mPTR, является мощным иммуносупрессором благодаря способности подавлять кальциневрин, кальций-зависимую фосфатазу, участвующую в регуляции генной экспрессии [31]. Оказалось, что в нейтрофилах человека также находится достаточно много кальциневрина, ингибирование которого вело к подавлению фагоцитоза и fMLP-индуцированного окислительного взрыва [32–34]. В связи с этим важно было исследовать такие ингибиторы mPTR, которые были бы не способны блокировать кальциневрин, но сохранивших способность ингибировать изомеразную активность CypD и, следовательно, ингибировать mPTR. Таким веществом является аналог CsA – MeVal4CsA, который и был исследован в нашей работе.

Обнаружено, что MeVal4CsA, так же, как и CsA, вызывал дозозависимое подавление A23187-индуцированного окислительного взрыва (рис. 3Б). Однако действующие дозы этого вещества отличались в несколько раз по сравнению с дозами CsA. В аналогичных условиях стимуляция нейтрофилов ФМА после их предварительной инкубации с MeVal4CsA не изменялась (см. рис. 3Б).

Другим интересным ингибитором mPTR, который был исследован в нашей работе, является SfA. Это вещество представляет собой иммуносупрессор, который с высокой аффинностью связывается с CypA, но не ингибирует кальциневрин. Так же, как и CsA, SfA ингибирует изомеразную активность CypD. Используя этот ингибитор в нашей модели, мы показали, что предварительная инкубация с возрастающими концентрациями SfA приводила к дозозависимому подавлению A23187-индуцированного окислительного взрыва (рис. 3В). Стимуляция клеток ФМА не изменялась после их предварительной инкубации с SfA (рис. 3В). Результаты экспериментов с применением блокаторов mPTR показали участие митохондрий в A23187-индуцированном окислительном взрыве, опосредованном активностью mPTR.

Чтобы показать участие mPTR в A23187-индуцированном НЕТозе, мы также использовали вышеперечисленные ее ингибиторы: CsA, MeVal4CsA и SfA. Предварительная инкубация нейтрофилов здоровых доноров в течение 30 мин с этими ингибиторами и последующая активация НЕТоза Ca^{2+} -ионофором A23187 вели к дозозависимому подавлению образования NET (рис. 3Д). НЕТоз, стимулированный ФМА, после предварительной инкубации клеток с ингибиторами mPTR не изменялся (не показано). Вышеописанные результаты были подтверждены на нейтрофилах, выделенных из крови пациентов с ХГБ. На рис. 3Е можно видеть,

Рис. 3. Оценка образования суммарных АФК и НЕТоза нейтрофилами, активированными ионофором A23187 или ФМА и преинкубированными с ингибиторами mPTP

Нейтрофилы инкубировали в присутствии различных концентраций CsA (А), MeVal4CsA (Б), SfA (В) или BKA (Г) в течение 30 мин при 37 °С. Далее клетки стимулировали A23187 (2 мкМ) или ФМА (30 нМ) в присутствии 80 мкМ люминола и оценивали окислительный взрыв – см. рис. 1. Данные представлены в виде $M \pm SEM$ ($n = 3$). * – Нейтрофилы пациентов с ХГБ (верхний правый график). * – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$. Для оценки действия ингибиторов митохондриальной поры на НЕТоз, нейтрофилы здоровых доноров (Д) или нейтрофилы, выделенные из крови пациентов с ХГБ (Е), предварительно инкубировали в течение 30 мин с CsA, MeVal4CsA, SfA или BKA. НЕТоз индуцировали кальциевым ионофором A23187. Данные представлены в виде $M \pm SEM$ ($n = 3$). *** – $p < 0,001$.

что CsA и SfA блокировали A23187-индуцированный HEToz дозозависимым способом. Таким образом, используя ингибиторы, влияющие на функциональное состояние mPTP через белок CypD, мы впервые показали участие mPTP в окислительном взрыве и HEToze, индуцированных кальциевыми ионофорами, но не ФМА.

ANT представляет собой ключевой регуляторный компонент mPTP, обеспечивающий обмен АТФ, синтезированных в митохондриях, на цитозольный АДФ. Ранее было показано [35], что повышение концентрации кальция в матриксе способствует переходу ANT в такое конфигурационное состояние, которое ведет к его активации. Нам было интересно выяснить, приведет ли химическое подавление белка ANT к ингибированию mPTP и, соответственно, понижению окислительного взрыва и HETоза.

Среди ингибиторов ANT наиболее хорошо изучена ВКА. Ранее была показана ее способность «замораживать» ANT в матрикс-ориентированной конформации, блокирующей mPTP. В следующей серии экспериментов мы показали, что ВКА подавляла окислительный взрыв, индуцированный A23187, но не ФМА (рис. 3Г). Аналогичные результаты были получены при оценке HETоза: ВКА дозозависимо подавляла A23187- (см. рис. 3Д), но не ФМА-индуцированный HETоз. Таким образом, используя ингибитор mPTP, действующий через ее регуляторный компонент ANT, мы подтвердили значение митохондриальной поры для окислительного взрыва и HETоза нейтрофилов человека.

Обсуждение

Используя специфический митохондриально-направленный антиоксидант SkQ1, мы показали, что митохондриальные АФК участвуют как в HEToze, так и в окислительном взрыве при активации нейтрофилов здоровых доноров A23187, но не ФМА (см. рис. 1, 2). С использованием таких ингибиторов NADPH-оксидазы, как апоцинин и VAS2870, а также неспецифического ингибитора флавин-содержащих оксидоредуктаз DPI мы впервые показали, что оксидаза-зависимые АФК также участвуют в окислительном взрыве и HEToze при их активации A23187 и ФМА (см. рис. 1, 2). Таким образом, наша гипотеза о возможном взаимодействии двух источников АФК, митохондрий (электрон-транспортная цепь) и NADPH-оксидазы была подтверждена на моделях таких важнейших эффекторных функций нейтрофилов, как окислительный взрыв и HETоз.

Перекрестное взаимодействие между мтАФК и NADPH-оксидазой впервые было описано на модели эндотелиальных клеток грызунов [15, 16]. В этих работах установлено, что активация NADPH-оксидазы гормоном ангиотензином II (АТ-II) заметно снижалась под действием митохондриально-направленного антиоксиданта mitoTEMPO, а также в условиях высокой экспрессии митохондриальной супероксиддисмутазы 2 (SOD2). В системе *in vivo* было показано, что у мышей при добавлении им mitoTEMPO наблюдалось снижение

артериального давления, индуцированного АТ-II. В этих работах авторы продемонстрировали, что мтАФК способны стимулировать NADPH-оксидазу эндотелия сосудов как *in vitro*, так и *in vivo*.

Кроме того, участие мтАФК в активации NADPH-оксидазы обнаружено на клетках гладкой мускулатуры в условиях гипоксии [36]. В этой модели образование мтАФК было заблокировано ингибиторами дыхательной цепи ротеноном и миксотиазолом, что приводило к подавлению активированной гипоксией NADPH-оксидазы.

Долгое время участие митохондрий в сигнальных путях нейтрофилов человека казалось нереальным из-за их небольшого количества в этих клетках. В последние годы стало очевидно, что, несмотря на это, митохондрии все же вовлечены в ряд важных сигнальных путей нейтрофилов [37]. В нашей работе [17] с использованием SkQ1 было показано, что мтАФК участвуют в окислительном взрыве и дегрануляции нейтрофилов здоровых доноров, активированных fMLP. Также обнаружили, что экзогенно добавленный пероксид водорода заметно усиливал образование супероксида NADPH-оксидазой и окислительный взрыв, индуцированный ФМА, что указывало на прямое воздействие радикалов кислорода на NADPH-оксидазу [38]. Интересные данные были получены в работе A. Daiber и соавт. [39], показавших активацию NADPH-оксидазы под действием миксотиазола – стимулятора мтАФК в нейтрофилах.

Результаты, полученные в нашей работе, указывают на отсутствие оксидаза-независимого HETоза, индуцированного A23187 в нейтрофилах здоровых доноров. В соответствии с полученными в нашей работе результатами, кальциевые ионофоры индуцируют образование мтАФК, которые стимулируют NADPH-оксидазу и HETоз.

Один из возможных физиологических механизмов, лежащих в основе A23187-индуцированного образования мтАФК, может быть связан с активацией mPTP. Ранее было показано, что активация mPTP опосредует АФК-зависимую активацию АФК в кардиомиоцитах [24], эндотелиальных клетках [40] и нейтрофилах, инкубированных с миксотиазолом [39].

В нашей работе с использованием специфических ингибиторов регуляторных компонентов mPTP CypD и ANT впервые показано, что mPTP участвует в передаче сигнала от митохондрий к NADPH-оксидазе при активации нейтрофилов человека ионофором A23187, но не ФМА (см. рис. 3).

Заключение

Процесс образования нейтрофильных внеклеточных ловушек может играть в организме хозяина как положительную, так и отрицательную роль. С одной стороны, NET обладают мощным бактерицидным действием, и невозможность их формирования может существенно образом сказываться на здоровье человека, как это происходит у больных ХГБ. С другой стороны, избыточное образование NET или снижение способности организма

к их устранению может стать причиной развития многих аутоиммунных и воспалительных заболеваний. Так, NET были обнаружены в значительных количествах при системной красной волчанке, ревматоидном артрите, псориазе и васкулите мелких сосудов. NET участвуют в поддержании таких легочных заболеваний, как муко-

висцидоз и хроническая обструктивная болезнь легких, в тромбообразовании и сепсисе. В связи с этим расшифровка сигнальных путей образования NET чрезвычайно важна для создания лекарственных средств с целью лечения заболеваний, этиологическим фактором которых являются NET.

■ Литература

1. Takei H., Araki A., Watanabe H., Ichinose A., Sendo F. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. *J. Leukoc. Biol.* 1996; 59 (2): 229–40.
2. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D. S. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004; 303: 1532–35.
3. Воробьева Н.В., Пинегин Б.В. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: механизмы образования, роль в норме и патологии. *Биохимия*. 2014; 79 (12): 1580–91. DOI: 10.1134/S0006297914120025
4. Steinberg B.E., Grinstein S. Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death. *Sci. STKE*. 2007; 379: pe11.
5. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2018; 18 (2): 134–47. DOI: 10.1038/nri.2017.105
6. Wang Y., Li M., Stadler S., Correll S., Li P., Wang D. et al. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J. Cell. Biol.* 2009; 184 (2): 205–13. DOI: 10.1083/jcb.200806072
7. 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): 633–40. DOI: 10.1016/j.autrev.2015.03.002
8. Behnen M., Leschczyk C., Möller S., Batel T., Klinger M., Solbach W. et al. Immobilized immune complexes induce neutrophil extracellular trap release by human neutrophil granulocytes via FcγRIIIB and Mac-1. *J. Immunol.* 2014; 193 (4): 1954–65. DOI: 10.1049/jimmunol.1400478
9. Garcia-Romo G.S., Caielli S., Vega B., Connolly J., Allantaz F., Xu Z. et al. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.* 2011; 3 (73): 73ra20. DOI: 10.1126/scitranslmed.3001201
10. Keshari R.S., Jyoti A., Dubey M., Kothari N., Kohli M., Bogra J. et al. Cytokines induced neutrophil extracellular traps formation: implication for the inflammatory disease condition. *PLoS One*. 2012; 7 (10): e48111. DOI: 10.1371/journal.pone.0048111
11. Warnatsch A., Ioannou M., Wang Q., Papayannopoulos V. Inflammation. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science* 2015; 349 (6245): 316–20. DOI: 10.1126/science.aaa8064
12. Douda D.N., Khan M.A., Grasmann 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): 2817–22. DOI: 10.1073/pnas.1414055112
13. van der Linden M., Westerlaken G.H.A., van der Vlist M., van Montfrans J., Meysaard L. Differential Signalling and Kinetics of Neutrophil Extracellular Trap Release Revealed by Quantitative Live Imaging. *Sci. Rep.* 2017; 7 (1): 6529. DOI: 10.1038/s41598-017-06901-w
14. Kenny E.F., Herzig A., Krüger R., Muth A., Mondal S., Thompson P.R. et al. Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *Elife*. 2017; 6: pii: e24437. DOI: 10.7554/eLife.24437
15. Doughan A.K., Harrison D.G., Dikalov S.I. Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction: linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction. *Circ. Res.* 2008; 102: 488–96. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.107.162800
16. Dikalova A.E., Bikineyeva A.T., Budzyn K., Nazarewicz R.R., McCann L., Lewis W. et al. Therapeutic targeting of mitochondrial superoxide in hypertension. *Circ. Res.* 2010; 107: 106–16. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.109.214601
17. Vorobjeva N., Prihodko A., Galkin I., Pletjushkina O., Zinovkin R., Sudina G. et al. 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): 254–65. DOI: 10.1016/j.ejcb.2017.03.003
18. Hunter D.R., Haworth R.A. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. *Arch. Biochem. Biophys.* 1979a; 195 (2): 453–9. DOI: 10.1016/0003-9861(79)90371-0
19. Hunter D.R., Haworth R.A. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional Ca²⁺ release. *Arch. Biochem. Biophys.* 1979b; 195 (2): 468–77. DOI: 10.1016/0003-9861(79)90373-4
20. Haworth R.A., Hunter D.R. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺ trigger site. *Arch. Biochem. Biophys.* 1979; 195: 460–7. DOI: 10.1016/0003-9861(79)90372-2
21. Bernardi P., Rasola A., Forte M., Lippe G. The Mitochondrial Permeability Transition Pore: Channel Formation by F-ATP Synthase, Integration in Signal Transduction, and Role in Pathophysiology. *Physiol. Rev.* 2015; 95 (4): 1111–55. DOI: 10.1152/physrev.00001.2015
22. Halestrap A.P. What is the mitochondrial permeability transition pore? *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2009; 46 (6): 821–31. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2009.02.021
23. Halestrap A.P., Richardson A.P. The mitochondrial permeability transition: a current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2015; 78: 129–41. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2014.08.018
24. Zorov D.B., Juhaszova M., Sollott S.J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol. Rev.* 2014; 94 (3): 909–50. DOI: 10.1152/physrev.00026.2013
25. Giorgio V., Guo L., Bassot C., Petronilli V., Bernardi P. Calcium and regulation of the mitochondrial permeability transition. *Cell. Calcium*. 2018; 70: 56–63. DOI: 10.1016/j.ceca.2017.05.004
26. Elrod J.W., Molkenin J.D. Physiologic functions of cyclophilin D and the mitochondrial permeability transition pore. *Circ. J.* 2013; 77 (5): 1111–22.
27. Воробьева Н.В., Кулаков В.В., Козаченко Ю.В., Пинегин Б.В. Действие антиоксидантов TEMPOL, TROLOX и TIRON на образование нейтрофильных внеклеточных ловушек. *Иммунология*. 2016; 37 (3): 143–9.
28. Воробьева Н.В. NADPH оксидаза нейтрофилов и заболевания, связанные с ее дисфункцией. *Иммунология*. 2013; 34 (4): 232–8.
29. Sundqvist M., Christenson K., Björnsdóttir H., Osla V., Karlsson A., Dahlgren C. et al. Elevated Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Cellular Redox Imbalance in Human NADPH-Oxidase-Deficient Phagocytes. *Front. Immunol.* 2017; 8: 1828. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01828
30. Griffiths E.J., Halestrap A.P. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem. J.* 1995; 307: 93–8. DOI: 10.1042/bj3070093
31. Crabtree G.R. Calcium, calcineurin, and the control of transcription. *J. Biol. Chem.* 2001; 276 (4): 2313–16.
32. Kurokawa T., Nonami T., Kobayashi H., Kishimoto W., Uchida K., Takagi H. et al. Inhibition by cyclosporine of the production of superoxide radicals. *N. Engl. J. Med.* 1992; 326 (12): 840.
33. Nguyen N.S., Pulido S.M., Rüegg U.T. Biphasic effects of cyclosporin A on formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine stimulated responses in HL-60 cells differentiated into neutrophils. *Br. J. Pharmacol.* 1998; 124 (8): 1774–80.
34. Thorat S.P., Thatte U.M., Pai N., Dahanukar S.A. Inhibition of phagocytes by cyclosporin *in vitro*. *Q. J. Med.* 1994; 87 (5): 311–4.
35. Halestrap A.P., Davidson A.M. Inhibition of Ca²⁺-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochem. J.* 1990; 268(1): 153–60. DOI: 10.1042/bj2680153.

36. Rathore R., Zheng Y.M., Niu C.F., Liu Q.H., Korde A., Ho Y.S., Wang Y.X. Hypoxia activates NADPH oxidase to increase [ROS] and [Ca²⁺] through the mitochondrial ROS-PKCε signaling axis in pulmonary artery smooth muscle cells. *Free Radic. Biol. Med.* 2008; 45: 1223–31. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.06.012.
37. Pinegin B., Vorobjeva N., Pashenkov M., Chernyak B. The role of mitochondrial ROS in antibacterial immunity. *J. Cell. Physiol.* 2018; 233: 3745–54. DOI: 10.1002/jcp.26117
38. El Jamali A., Valente A.J., Clark R.A. Regulation of phagocyte NADPH oxidase by hydrogen peroxide through a Ca²⁺/c-Abl signaling pathway. *Free Radic. Biol. Med.* 2010; 48: 798–810. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.018
39. Kröller-Schön S., Steven S., Kossmann S., Scholz A., Daub S., Oelze M., Xia N., Hausding M., Mikhed Y., Zinssius E., Mader M., Stamm P., Treiber N., Scharffetter-Kochanek K., Li H., Schulz E., Wenzel P., Münzel T., Daiber A. Molecular mechanisms of the crosstalk between mitochondria and NADPH oxidase through reactive oxygen species—studies in white blood cells and in animal models. *Antioxid. Redox Signal.* 2014; 20: 247–66. DOI: 10.1089/ars.2012.4953
40. Nazarewicz R.R., Dikalova A.E., Bikineyeva A., Dikalov S.I. Nox2 as a potential target of mitochondrial superoxide and its role in endothelial oxidative stress. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2013; 305: H1131–40. DOI: 10.1152/ajpheart.00063.2013

■ References

1. Takei H., Araki A., Watanabe H., Ichinose A., Sendo F. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. *J. Leukoc. Biol.* 1996; 59 (2): 229–40.
2. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004; 303: 1532–35.
3. Vorobjeva N.V., Pinegin B.V. Neutrophil Extracellular Traps: mechanisms of formation and role in health and disease. *Biochemistry (Moscow).* 2014; 79 (12): 1286–96. (in Russian)
4. Steinberg B.E., Grinstein S. Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death. *Sci. STKE.* 2007; 379: pe11.
5. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2018; 18 (2): 134–47. DOI: 10.1038/nri.2017.105
6. Wang Y., Li M., Stadler S., Correll S., Li P., Wang D., et al. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J. Cell. Biol.* 2009; 184 (2): 205–13. DOI: 10.1083/jcb.200806072
7. 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): 633–40. DOI: 10.1016/j.autrev.2015.03.002
8. Behnen M., Leschczyk C., Möller S., Batel T., Klinger M., Solbach W., et al. Immobilized immune complexes induce neutrophil extracellular trap release by human neutrophil granulocytes via FcγRIIIB and Mac-1. *J. Immunol.* 2014; 193 (4): 1954–65. DOI: 10.4049/jimmunol.1400478
9. Garcia-Romo G.S., Caielli S., Vega B., Connolly J., Allantaz F., Xu Z., et al. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.* 2011; 3 (73): 73ra20. DOI: 10.1126/scitranslmed.3001201
10. Keshari R.S., Jyoti M., Dubey M., Kothari N., Kohli M., Bogra J., et al. Cytokines induced neutrophil extracellular traps formation: implication for the inflammatory disease condition. *PLoS One.* 2012; 7 (10): e48111. DOI: 10.1371/journal.pone.0048111
11. Warnatsch A., Ioannou M., Wang Q., Papayannopoulos V. Inflammation. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science* 2015; 349 (6245): 316–20. DOI: 10.1126/science.aaa8064
12. Douda D.N., Khan M.A., Grasmann 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): 2817–22. DOI: 10.1073/pnas.1414055112
13. van der Linden M., Westerlaken G.H.A., van der Vlist M., van Montfrans J., Meysaard L. Differential Signalling and Kinetics of Neutrophil Extracellular Trap Release Revealed by Quantitative Live Imaging. *Sci. Rep.* 2017; 7 (1): 6529. DOI: 10.1038/s41598-017-06901-w
14. Kenny E.F., Herzig A., Krüger R., Muth A., Mondal S., Thompson P.R., et al. Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *Elife.* 2017; 6: pii: e24437. DOI: 10.7554/eLife.24437
15. Doughan A.K., Harrison D.G., Dikalov S.I. Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction: linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction. *Circ. Res.* 2008; 102: 488–96. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.107.162800
16. Dikalova A.E., Bikineyeva A.T., Budzyn K., Nazarewicz R.R., McCann L., Lewis W., et al. Therapeutic targeting of mitochondrial superoxide in hypertension. *Circ. Res.* 2010; 107: 106–16. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.109.214601
17. Vorobjeva N., Prikhodko A., Galkin I., Pletjushkina O., Zinovkin R., Sud'ina G., et al. 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): 254–65. DOI: 10.1016/j.ejcb.2017.03.003
18. Hunter D.R., Haworth R.A. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. *Arch. Biochem. Biophys.* 1979a; 195 (2): 453–9. DOI: 10.1016/0003-9861(79)90371-0
19. Hunter D.R., Haworth R.A. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional Ca²⁺ release. *Arch. Biochem. Biophys.* 1979b; 195 (2): 468–77. DOI: 10.1016/0003-9861(79)90373-4
20. Haworth R.A., Hunter D.R. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺ trigger site. *Arch. Biochem. Biophys.* 1979; 195: 460–7. DOI: 10.1016/0003-9861(79)90372-2
21. Bernardi P., Rasola A., Forte M., Lippe G. The Mitochondrial Permeability Transition Pore: Channel Formation by F-ATP Synthase, Integration in Signal Transduction, and Role in Pathophysiology. *Physiol. Rev.* 2015; 95 (4): 1111–55. DOI: 10.1152/physrev.00001.2015
22. Halestrap A.P. What is the mitochondrial permeability transition pore? *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2009; 46 (6): 821–31. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2009.02.021
23. Halestrap A.P., Richardson A.P. The mitochondrial permeability transition: a current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2015; 78: 129–41. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2014.08.018
24. Zorov D.B., Juhaszova M., Sollott S.J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol. Rev.* 2014; 94 (3): 909–50. DOI: 10.1152/physrev.00026.2013
25. Giorgio V., Guo L., Bassot C., Petronilli V., Bernardi P. Calcium and regulation of the mitochondrial permeability transition. *Cell. Calcium.* 2018; 70: 56–63. DOI: 10.1016/j.ceca.2017.05.004
26. Elrod J.W., Molkentin J.D. Physiologic functions of cyclophilin D and the mitochondrial permeability transition pore. *Circ. J.* 2013; 77 (5): 1111–22.
27. Vorobjeva N.V., Kulakov V.V., Kozachenko Y.V., Pinegin B.V. Effects of the antioxidants Trolox, Tiron and Tempol on neutrophil extracellular trap formation. *Immunologiya.* 2016; 37 (3): 143–9. (in Russian)
28. Vorobjeva N.V. The NADPH oxidase of neutrophils and diseases associated with its dysfunction. *Immunologiya.* 2013; 34 (4): 232–8. (in Russian)
29. Sundqvist M., Christenson K., Björnsdóttir H., Osla V., Karlsson A., Dahlgren C., et al. Elevated Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Cellular Redox Imbalance in Human NADPH-Oxidase-Deficient Phagocytes. *Front. Immunol.* 2017; 8: 1828. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01828
30. Griffiths E.J., Halestrap A.P. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem. J.* 1995; 307: 93–8. DOI: 10.1042/bj3070093
31. Crabtree G.R. Calcium, calcineurin, and the control of transcription. *J. Biol. Chem.* 2001; 276 (4): 2313–16.
32. Kurokawa T., Nonami T., Kobayashi H., Kishimoto W., Uchida K., Takagi H., et al. Inhibition by cyclosporine of the production of superoxide radicals. *N. Engl. J. Med.* 1992; 326 (12): 840.
33. Nguyen N.S., Pulido S.M., Rüegg U.T. Biphasic effects of cyclosporin A on formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine stimulated responses in HL-60 cells differentiated into neutrophils. *Br. J. Pharmacol.* 1998; 124 (8): 1774–80.

34. Thorat S.P., Thatte U.M., Pai N., Dahanukar S.A. Inhibition of phagocytes by cyclosporin *in vitro*. Q. J. Med. 1994; 87 (5): 311–4.
35. Halestrap A.P., Davidson A.M. Inhibition of Ca^{2+} -induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. Biochem. J. 1990; 268 (1): 153–60. DOI: 10.1042/bj2680153
36. Rathore R., Zheng Y.M., Niu C.F., Liu Q.H., Korde A., Ho Y.S., Wang Y.X. Hypoxia activates NADPH oxidase to increase [ROS] and $[\text{Ca}^{2+}]$ through the mitochondrial ROS-PKCepsilon signaling axis in pulmonary artery smooth muscle cells. Free Radic. Biol. Med. 2008; 45: 1223–31. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2008.06.012
37. Pinegin B., Vorobjeva N., Pashenkov M., Chernyak B. The role of mitochondrial ROS in antibacterial immunity. J. Cell Physiol. 2018; 233: 3745–54. DOI: 10.1002/jcp.26117
38. El Jamali A., Valente A.J., Clark R.A. Regulation of phagocyte NADPHoxidase by hydrogen peroxide through a Ca^{2+} /c-Abl signaling pathway. Free Radic. Biol. Med. 2010; 48: 798–810. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.018
39. Kröller-Schön S., Steven S., Kossmann S., Scholz A., Daub S., Oelze M., Xia N., Hausding M., Mikhed Y., Zinssius E., Mader M., Stamm P., Treiber N., Scharffetter-Kochanek K., Li H., Schulz E., Wenzel P., Münzel T., Daiber A. Molecular mechanisms of the crosstalk between mitochondria and NADPH oxidase through reactive oxygen species-studies in white blood cells and in animal models. Antioxid. Redox Signal. 2014; 20: 247–66. DOI: 10.1089/ars.2012.4953
40. Nazarewicz R.R., Dikalova A.E., Bikineyeva A., Dikalov S.I. Nox2 as a potential target of mitochondrial superoxide and its role in endothelial oxidative stress. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2013; 305: H1131–40. DOI: 10.1152/ajpheart.00063.2013