

ЭКСПРЕССИЯ И ФУНКЦИЯ РЕЦЕПТОРОВ ФОРМИЛИРОВАННЫХ ПЕПТИДОВ В ГРАНУЛОЦИТАХ БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

Мохаммад А.¹, Филина Ю.В.², Ларионова Р.В.³, Арлеевская М.И.³,
Габдулхакова А.Г.^{2,3}

¹ ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»,
г. Долгопрудный, Московская обл., Россия

² ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Республика Татарстан,
Россия

³ Казанская государственная медицинская академия – филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская
академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, г. Казань,
Республика Татарстан, Россия

Резюме. Рецепторы формилированных пептидов (FPR) являются важной частью врожденного иммунитета и участвуют в реализации противомикробных функций фагоцитов, таких как хемотаксис, секреторная дегрануляция и респираторный взрыв. Эти ответы фагоцитов реализуются как при остром, так и при системном хроническом воспалении. Избыточное либо постоянное высвобождение провоспалительных лигандов ведет к преактивации фагоцитов, когда последующая стимуляция вызывает более интенсивный клеточный ответ. Связывание рецептора формилированных пептидов агонистом активирует продукцию активных форм кислорода в результате запуска фосфорилирования цитоплазматических субъединиц p47phox и p67phox с последующей их транслокацией к плазматической мембране и сборкой NADPH-оксидазного комплекса. Ревматоидный артрит характеризуется дисбалансом иммунных процессов и аутоиммунной реакцией против тканей суставов. Известно, что при различных патологиях, включая ревматоидный артрит, гранулоциты продуцируют повышенные количества радикалов кислорода. Мы предполагаем, что одним из механизмов такого усиления может быть повышенная экспрессия рецепторов формилированных пептидов или компонентов сигнального пути FPR/РКС/NOX2. Целью настоящего исследования было изучение экспрессии мРНК генов рецепторов формилированных пептидов *fpr1/fpr2* и FPR-зависимой продукции активных форм кислорода изолированными гранулоцитами периферической крови больных ревматоидным артритом.

Объектом исследования были изолированные гранулоциты периферической крови, было проанализировано 166 и 85 образцов пациентов с ревматоидным артритом и здоровых доноров, соответственно. Продукция активных форм кислорода оценивалась с помощью люминол-зависимой

Адрес для переписки:

Габдулхакова Аида Габдрахмановна
ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный
университет»
420021, Россия, Республика Татарстан, г. Казань,
ул. Парижской Коммуны, 9, комн. 506.
Тел.: 8 (904) 663-72-85.
E-mail: aida.gabdoulkhakova@gmail.com

Address for correspondence:

Aida G. Gabdoulkhakova
Kazan Federal University
420021, Russian Federation, Republic of Tatarstan, Kazan,
Parizhskoi Kommuny str., 9, office 506.
Phone: +7 (904) 663-72-85.
E-mail: aida.gabdoulkhakova@gmail.com

Образец цитирования:

А. Мохаммад, Ю.В. Филина, Р.В. Ларионова,
М.И. Арлеевская, А.Г. Габдулхакова «Экспрессия
и функция рецепторов формилированных пептидов
в гранулоцитах больных ревматоидным артритом»
// Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 6.
С. 1139-1150. doi: 10.15789/1563-0625-EAF-2503

© Мохаммад А. и соавт., 2022

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A. Mohammad, Yu.V. Filina, R.V. Larionova,
M.I. Arleevskaya, A.G. Gabdulhakova "Expression and
function of receptors for the formylated peptides in granulocytes
of the patients with rheumatoid arthritis", *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2022, Vol. 24, no. 6,
pp. 1139-1150. doi: 10.15789/1563-0625-EAF-2503

© Mohammad A. et al., 2022

The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-EAF-2503

хемилюминесценции. Для активации FPR1 использовали формилированный пептид fMLF в концентрации, ответ на который полностью ингибировался при предварительной обработке клеток антагонистом FPR1 N-t-boc-MLF. Активацию FPR2 осуществляли синтетическим пептидом WKYMVM, специфическим агонистом рецептора FPR2. Для больных ревматоидным артритом выявлено повышение уровня спонтанной и вызванной фторболовым эфиром продукции активных форм кислорода изолированными гранулоцитами периферической крови, что отражает преактивированное состояние фагоцитов при ревматоидном артрите. Мы обнаружили, что у пациентов повышена FPR1-опосредованная продукция радикалов кислорода и экспрессия мРНК гена рецептора FPR1 в гранулоцитах крови. Усиление оксидазной функции может быть также связано с конститутивной активацией пути FPR1/ПКС/NOX2 в виду положительной корреляции этих процессов. Продукция активных форм кислорода, вызванная стимуляцией рецептора FPR2, также повышена, однако ее нельзя объяснить гиперэкспрессией мРНК рецептора или активацией ПКС/NOX2, что требует дальнейшего изучения. Установление механизмов регуляции сигнальных каскадов FPR1 и FPR2 может выявить новые мишени для противоревматоидной терапии.

Ключевые слова: формилпептидные рецепторы, ревматоидный артрит, активные формы кислорода, врожденный иммунитет, фагоциты

EXPRESSION AND FUNCTION OF RECEPTORS FOR THE FORMYLATED PEPTIDES IN GRANULOCYTES OF THE PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

Mohammad A.^a, Filina Yu.V.^b, Larionova R.V.^c, Arleevskaya M.I.^c,
Gabdulhakova A.G.^{b, c}

^a Moscow Physico-Technical Institute, Dolgoprudny, Moscow Region, Russian Federation

^b Kazan Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

^c Kazan State Medical Academy, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Abstract. Formyl peptide receptors (FPRs) are an important part of innate immunity involved in antimicrobial phagocyte functions such as chemotaxis, secretory degranulation, and respiratory burst. These phagocyte responses are observed in both acute and systemic chronic inflammation. Abundant or constant release of pro-inflammatory ligands leads to the pre-activation of phagocytes when subsequent stimulation induces more intense cellular response. Binding of the formyl peptide receptor with its agonist activates production of reactive oxygen species, due to triggering phosphorylation of the cytoplasmic subunits p47phox and p67phox followed by their translocation to the plasma membrane and assembly into the NADPH oxidase complex. Rheumatoid arthritis is characterized by an imbalance of immune processes and autoimmune responses against the own joint tissues. It is known that, granulocytes produce increased amounts of oxygen radicals in various pathologies, including rheumatoid arthritis. We suggest that such enhancement may be due to increased expression of formyl peptide receptors or components of the FPR/ПКС/NOX2 signaling pathway. Our aim was to study the mRNA expression of *fpr1/fpr2* genes and the FPR-dependent production of reactive oxygen species by isolated peripheral blood granulocytes from the patients with rheumatoid arthritis. Materials and methods. The objects of the study were isolated peripheral blood granulocytes. We analyzed, respectively, 166 and 85 samples from the patients with rheumatoid arthritis and healthy donors. The production of reactive oxygen species was assessed using luminol-dependent chemiluminescence. For FPR1 activation we used a distinct concentration of the formyl peptide fMLF: the response to it was completely inhibited by pretreatment of the cells with FPR1 antagonist N-t-boc-MLF. FPR2 activation was performed by synthetic peptide WKYMVM, a specific receptor agonist. In the patients with rheumatoid arthritis, we have revealed an increased level of spontaneous and phorbol ester-induced production of reactive oxygen species by isolated peripheral blood granulocytes, thus reflecting a pre-activated state of the phagocytes in rheumatoid arthritis. We have found the increased FPR1-mediated production of oxygen radicals and expression of mRNA of *fpr1* gene in blood granulocytes of rheumatoid arthritis patients. Furthermore, the enhancement of oxidase function may be associated with constitutive activation of the FPR1/ПКС/NOX2 pathway as shown by positive correlation between the processes. The production of reactive oxygen species induced by stimulation of the FPR2 receptor is also increased, but it cannot be directly attributed to overexpression of the receptor mRNA or ПКС/NOX2 activation, and requires further study. Understanding the mechanisms of regulation of the FPR1 and FPR2 signaling cascades may reveal new targets for anti-rheumatoid therapy.

Keywords: receptors, formylpeptide, rheumatoid artiritis, reactive oxygen species, innate immunity, phagocytes

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

Исследование поддержано грантом РФФИ 19-34-90144.

Введение

В середине 70-х гг. прошлого века было обнаружено, что иммунные клетки экспрессируют специфические поверхностные рецепторы, способные распознавать бактериальные пептиды, содержащие на N-конце формилметионин (fMet) [29]. Эти рецепторы, получившие название «рецепторы формилированных пептидов», относятся к хемотаксическим рецепторам, сцепленным с G-белками (GPCR) [15]. У человека обнаружено три типа рецепторов формилированных пептидов: высокоаффинный FPR/FPR1 с $K_d \sim 1-3$ нМ для синтетического трипептида fMLF, низкоаффинный FPRL1/FPR2 с $K_d \sim 300$ нМ для fMLF, а также FPRL2/FPR3, неспособный связывать митохондриальные и бактериальные формилированные пептиды [7, 13, 14].

FPR экспрессируются преимущественно в фагоцитах [17], но встречаются и в других типах иммунных и неиммунных клеток: FPR1 в костном мозге, легких, желудке и кишечнике, яичках, скелетных и сердечных мышцах, коже, селезенке и лимфоузлах, а также в опухолевых клетках, где они определяют подвижность, рост и ангиогенез; FPR2 экспрессируется клетками различных отделов кишечника, надпочечников, плаценты, костного мозга, ЦНС, щитовидной железы, печени, поджелудочной железы, кожи и селезенки; а FPR3 встречается преимущественно в зрелых моноцитах [5, 13, 34].

Впоследствии было обнаружено, что FPR связывают не только формилированные пептиды, но и другие структурно различные лиганды [13], что определяет широкий спектр ответных реакций клетки. Появляется все больше данных о связи некоторых воспалительных и онкологических заболеваний с экспрессией и функциями FPR или их эндогенных лигандов. Ранее было показано, что FPR, особенно FPR2, участвуют в развитии и прогрессии ревматоидного артрита (РА) [18]. Для синовиальных фибробластов характерен высокий уровень экспрессии FPR2 и его эндогенного агониста, сывороточного амилоида А (SAA) [23]. SAA стимулирует продукцию провоспалительных цитокинов (TNF α , IL-1 β и IL-6) и матриксных металлопротеиназы-1 и металлопротеиназы-3, что указывает на патологическую роль SAA и FPR2 в развитии ревматоидного артрита: предполагается, что SAA/FPR2 при помощи этих эффекторов опосредуют разрушение ко-

стей и хрящей, что, в конечном итоге, приводит к РА [19]. С другой стороны, сообщается, что активация FPR1/FPR2 агонистом Crpd43 ингибирует экспансию артрогенных эффекторных CD4T-клеток и фибробласт-подобных синовиоцитов, что уменьшает повреждение суставов у мышей с индуцированным артритом [24]. Еще меньше известно о рецепторах формилированных пептидов в гранулоцитах крови больных РА. Наше исследование направлено на исследование экспрессии и функции FPR при ревматоидном артрите, что может стать первым шагом на пути к исследованиям этих рецепторов в качестве мишени для терапии РА.

Материалы и методы

Объект исследования

Образцы крови были получены от женщин, больных РА, в Республике Татарстан в период с 2012 по 2020 год ($n = 166$, медиана возраста 52 года ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$: 38-59)) и здоровых добровольцев ($n = 85$, медиана возраста 30 лет ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$: 24-51)). Критериями включения здоровых лиц в контрольную группу были отсутствие хронического заболевания, в том числе аллергического, отсутствие вируса иммунодефицита человека, случаев РА среди близких родственников. Диагноз РА был установлен на основании критериев ACR/EULAR classification criteria [2]. Исследование одобрено Этическим комитетом КГМА – филиала ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России (протокол 2/09 от 24.09.2020). Информированное согласие, включая согласие на участие в исследовании и публикацию результатов, было получено от всех испытуемых.

Сбор образцов и выделение клеток

Гранулоциты периферической крови выделяли при помощи центрифугирования на трехслойном градиенте плотности фиколла 1,064/1,077/1,019 г/мл. Клетки суспендировали в сбалансированном солевом растворе Хенкса (HBSS) без Ca^{2+} и Mg^{2+} в концентрации 10^7 клеток в 1 мл и хранили при 4 °С в течение одного часа до проведения функциональных тестов.

Хемилюминесцентный анализ

Для оценки FPR1/2-опосредованной оксидантной функции НАДФН-зависимую продукцию активных форм кислорода (АФК) с помощью люминол-зависимой хемилюминесценции на приборе Хемилюм-12 (конструктор Б.Ф. Санталов, ИБК РАН). Регистрацию проводили параллельно в 12 экспериментальных ячейках при 37 °С с перемешиванием [31]. Для каждого измерения использовали 2×10^5 гранулоцитов. Клетки стимулировали тремя стимулами: 1 мкМ форбол-12-ацетат-13-мирилатом (PMA), синтетическими пептидами 0,01 мкМ fMLF и 0,01 мкМ WKYMVM

(Merck, США). Клетки инкубировали при 37 °С в течение 20 минут перед измерением, а затем переносили в хемилюминометр. Каждый стимул добавлялся через 250 с после начала записи. Амплитуда сигнала использовалась для оценки стимулированной продукции АФК.

Клетки обрабатывали 10 мкМ N-t-вос-MLF, антагонистом FPR1, при 37 °С в течение 20 мин перед измерением. Относительную хемилюминесценцию рассчитывали как отношение амплитуды хемилюминесценции в контрольных и обработанных клетках.

ПЦР с обратной транскрипцией

РНК выделяли из 40 образцов суспензии гранулоцитов больных РА и 20 здоровых добровольцев с помощью набора ExtractRNA (ООО «Евроген») согласно инструкции производителя. Количество и качество выделенной РНК измеряли с помощью спектрофотометрии. кДНК синтезировали из 1 мкг тотальной РНК с использованием обратной транскриптазы RevertAid (Thermo Fisher Scientific, США) и случайных гексамерных праймеров в соответствии с протоколом производителя.

ПЦР в реальном времени проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 50 нг кДНК, с использованием реакционной смеси qPCRMix-HS-SYBR (ООО «Евроген», Россия) и программы амплификации: начальная денатурация при 95 °С в течение 5 мин, денатурация при 95 °С 30 с, отжиг при 60 °С 20 с, элонгация при 72 °С 20 с.

Праймеры были разработаны с помощью ПО PrimerBlast [37]:

FPR1 прямой:

5'-CTGAGTCACTCTCCCCAGGA-3';

FPR1 обратный:

5'-CCAGGAAGAGATAGCCAGCA-3';

FPR2 прямой:

5'-GCAGCCTTGAGGTCATAAGC-3';

FPR2 обратный:

5'-TGTAGCCAGCAGACTCATAGG-3';

GAPDH прямой:

5'-CCCATGTTTCGTCATGGGTGT-3';

GAPDH обратный:

5'-TGGTCATGAGTCCTTCCACGATA-3'.

Анализ данных

Данные анализировали при помощи Rstudio 3.5.1 и SigmaPlot 12.0. Анализ экспрессии проводили с использованием метода относительной нормализованной экспрессии [21] и пакета rcr R-package [1]. В качестве референса использовали среднее значение экспрессии в контрольной группе. Данные представлены как Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}), если не указано иное; значимыми считали различия при p ≤ 0,05.

Результаты

FPR-опосредованная продукция АФК в изолированных гранулоцитах крови

Пептидные агонисты FPR активируют внутриклеточный сигнальный путь, который приводит к разнообразным ответам, включая сборку ферментного комплекса НАДФН (NOX2) и продукцию АФК [16]. В этом исследовании мы использовали люминол-зависимую хемилюминесценцию для анализа продукции АФК, иници-

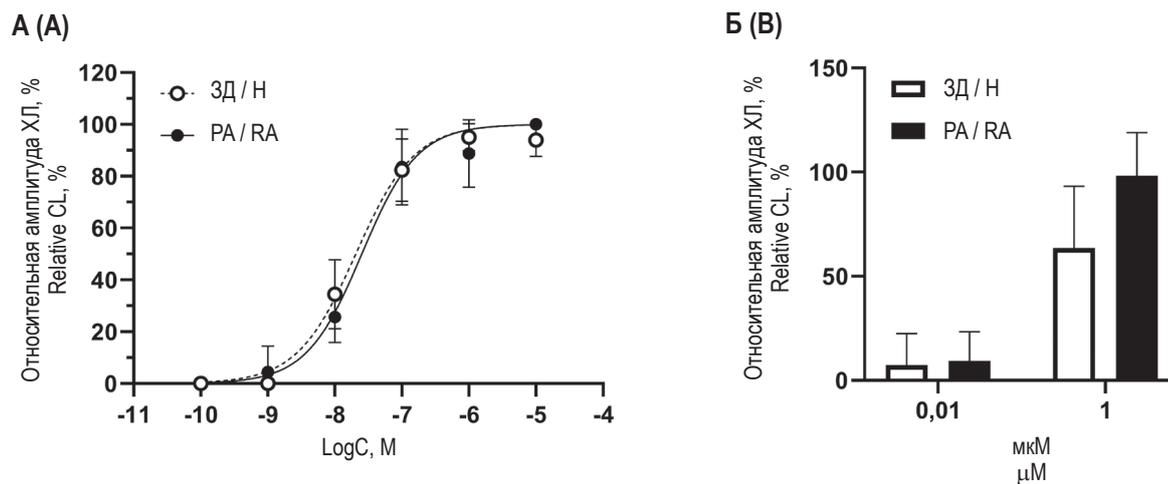


Рисунок 1. fMLF-индуцированная продукция АФК в изолированных гранулоцитах здоровых добровольцев (ЗД) и больных РА (РА): А – дозозависимая активация ответа в гранулоцитах больных РА (n = 7) и контрольной группы (n = 6); Б – относительная амплитуда ответа на 0,01 и 1 мкМ fMLF в клетках, обработанных N-t-вос-MLF

Figure 1. fMLF-induced ROS production in the isolated granulocytes in the groups of healthy donors (HD) and RA patients (RA): (A) dose-dependent activation of the granulocyte response in RA group (n = 7) and control group (n = 7); (B) relative amplitude of the response to 0,01 and 1 μM fMLF in the cells pre-treated by N-t-вос-MLF

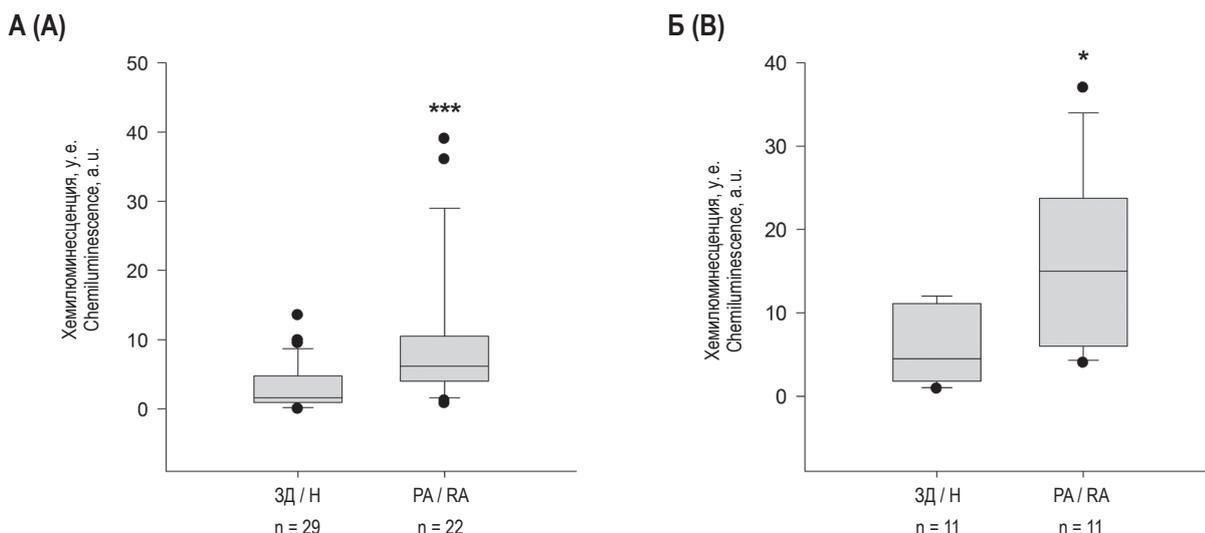


Рисунок 2. Продукция АФК в гранулоцитах крови здоровых добровольцев (ЗД) и больных РА (РА)
Примечание. Представлена амплитуда ответа на 0,01 мкМ fMLF (А) или 0,01 мкМ WKYMVM (Б); * – $p \leq 0,05$, *** – $p \leq 0,001$, U-критерий Манна–Уитни.

Figure 2. ROS production in the peripheral blood granulocytes of healthy donors (HD) and RA patients (RA)
Note. The amplitude of the response to 1 μM fMLF (A) or 0.01 μM WKYMVM is presented; *, $p \leq 0.05$; ***, $p \leq 0.001$, Mann–Whitney U test.

ированной через FPR в изолированных гранулоцитах крови.

Для определения EC_{50} при респираторном ответе клетки здоровых добровольцев и больных РА стимулировали fMLF в концентрации 10^{-10} – 10^{-5} М. Выявлено, что EC_{50} составляет $2,051 \times 10^{-8}$ для пациенток с РА и $2,523 \times 10^8$ М для контрольной группы, статистически значимых различий не обнаружено ($p = 0,650$, F-test) (рис. 1А).

Клетки инкубировали с антагонистом FPR1 N-t-вос-MLF (Т-вос) [13] для определения концентрации fMLF, которая вызывает специфический FPR1-опосредованный ответ. Т-вос полностью подавлял продукцию АФК, инициированную fMLF в концентрации 0,01 мкМ и ниже (рис. 1Б).

Таким образом, низкие дозы fMLF (0,01 мкМ и ниже) преимущественно активируют FPR1; при более высоких концентрациях fMLF активирует как FPR1, так и FPR2. В последующих экспериментах для независимой активации FPR1 и FPR2 использовали два разных пептидных лиганда FPR: 0,01 мкМ fMLF и 0,01 мкМ WKYMVM, синтетический пептид, специфичный для FPR2 [13].

Мы обнаружили, что ответы, инициированные через FPR1 и FPR2, были выше у больных РА, по сравнению со здоровыми добровольцами (рис. 2).

Экспрессия FPR1 и FPR2 в гранулоцитах крови

Чтобы проверить, связан ли повышенный респираторный ответ с экспрессией рецептора, мы

проанализировали уровень мРНК FPR1 и FPR2. Используя метод $\Delta\Delta Ct$ с GAPDH в качестве внутреннего контроля, мы обнаружили, что экспрессия FPR1 повышена у пациентов с РА по сравнению со здоровыми добровольцами (0,682 и 1,305 соответственно; $p = 0,044$, U-критерий Манна–Уитни). Достоверных отличий в экспрессии FPR2 у здоровых женщин и больных РА не выявлено (1,191 и 2,322 соответственно; $p = 0,266$, U-критерий Манна–Уитни) (рис. 3).

Спонтанная и РМА-индуцированная продукция АФК

Активность фагоцитарной НАДФН-оксидазы является основным источником образования АФК в гранулоцитах. Интенсивность хемилюминесценции в интактных клетках без каких-либо стимулов использовалась для оценки базальной активности НАДФН-оксидазы. Уровень спонтанной продукции АФК в группе РА был выше по сравнению со здоровыми добровольцами (Ме 0,685 и 1,422, $p = 0,043$, U-критерий Манна–Уитни, рис. 4А).

Гранулоциты стимулировали РМА прямым активатором РКС, чтобы оценить активность сигнального внутриклеточных компонентов передачи сигнала без активации рецептора. Мы обнаружили статистически значимую разницу в ответе на РМА между здоровыми женщинами и больными РА (Ме 12,000 и 15,250, $p = 0,040$, U-критерий Манна–Уитни, рис. 4Б).

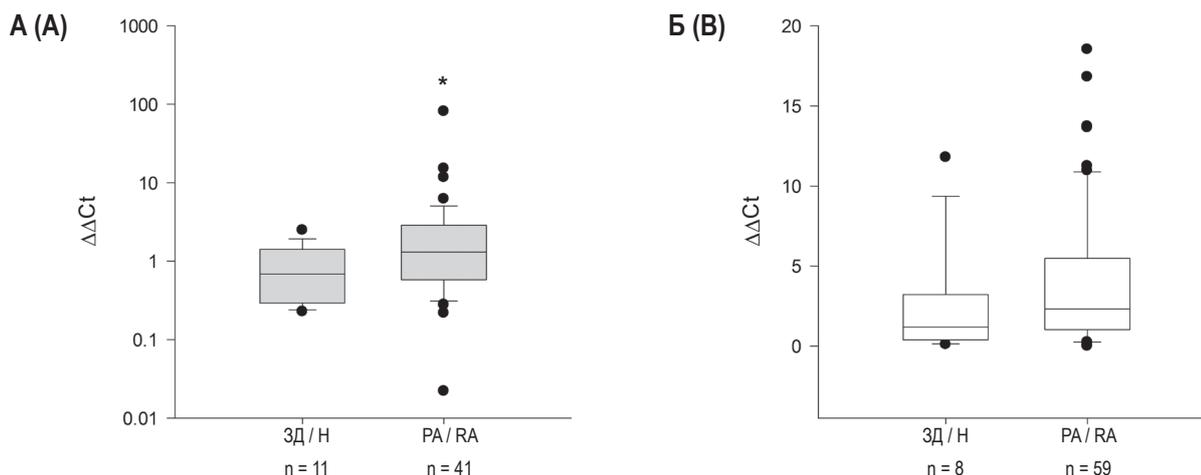


Рисунок 3. Относительная нормализованная экспрессия мРНК FPR1 (А) и FPR2 (Б) у здоровых женщин (ЗД) и больных РА (РА)

Примечание. * – $p \leq 0,05$, U-критерий Манна–Уитни.

Figure 3. Relative normalized expression of mRNA of FPR1 (A) and FPR2 (B) in healthy donors (HD) and RA patients (RA)

Note. *, $p \leq 0.05$; Mann–Whitney U test.

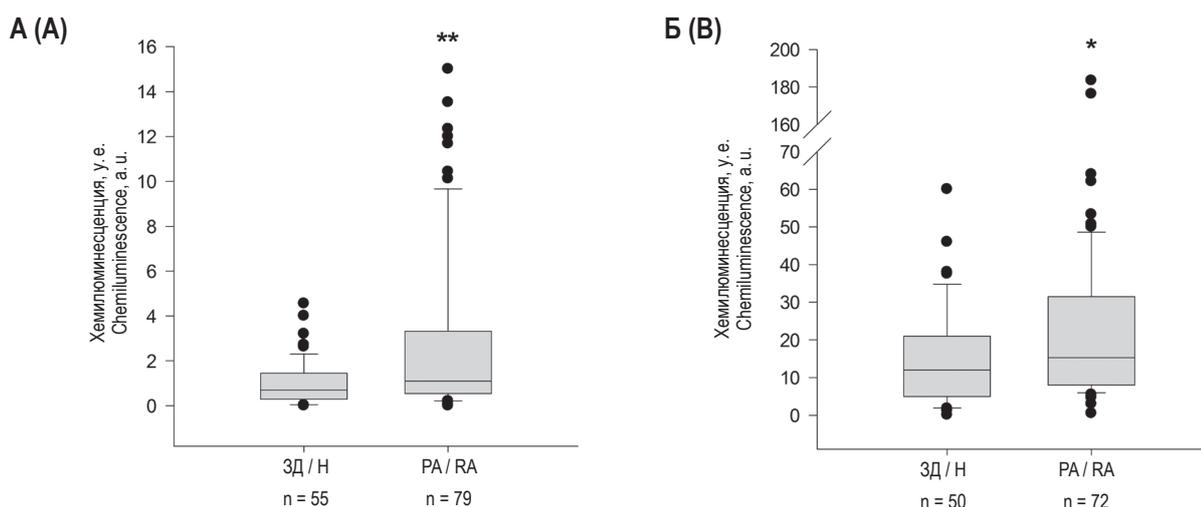


Рисунок 4. Продукция АФК в гранулоцитах крови здоровых добровольцев (ЗД) и больных РА (РА): А – спонтанная генерация АФК (базовый уровень); Б – генерация АФК в ответ на 1 мкРМА

Примечание. Представлена амплитуда ответа; * – $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$, U-критерий Манна–Уитни.

Figure 4. ROS production by the granulocytes of healthy donors (HD) and RA patients (RA): (A) spontaneous generation of ROS (basal level); (B) ROS generation in response to 1 μ M PMA

Note. The amplitude of the response is presented; *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; Mann–Whitney U test.

Ранговая корреляция Спирмена использовалась для оценки взаимосвязи между базальной активностью НАДФН-оксидазы и респираторным взрывом, вызванным FPR. Умеренная корреляция была обнаружена между ответом, индуцированным fMLF через FPR1, и спонтанной продукцией АФК у здоровых женщин и пациентов с РА (рис. 5А, В). Достоверной корреляции между ответом, индуцированным WKYMVM (FPR2), и спонтанной продукцией АФК в обеих группах обнаружено не было (рис. 5Б, Г).

Корреляционный анализ был также использован для оценки взаимосвязи между FPR-опосредованной и PMA-индуцированной и продукцией АФК, представляющей вклад РКС-зависимой активации НАДФН-оксидазы в респираторном взрыве гранулоцитов. Умеренная корреляция была обнаружена только между PMA- и WKYMVM-индуцированным ответом в группе здоровых женщин (рис. 6Б), тогда как в остальных случаях корреляции не было (рис. 6А, В, Г).

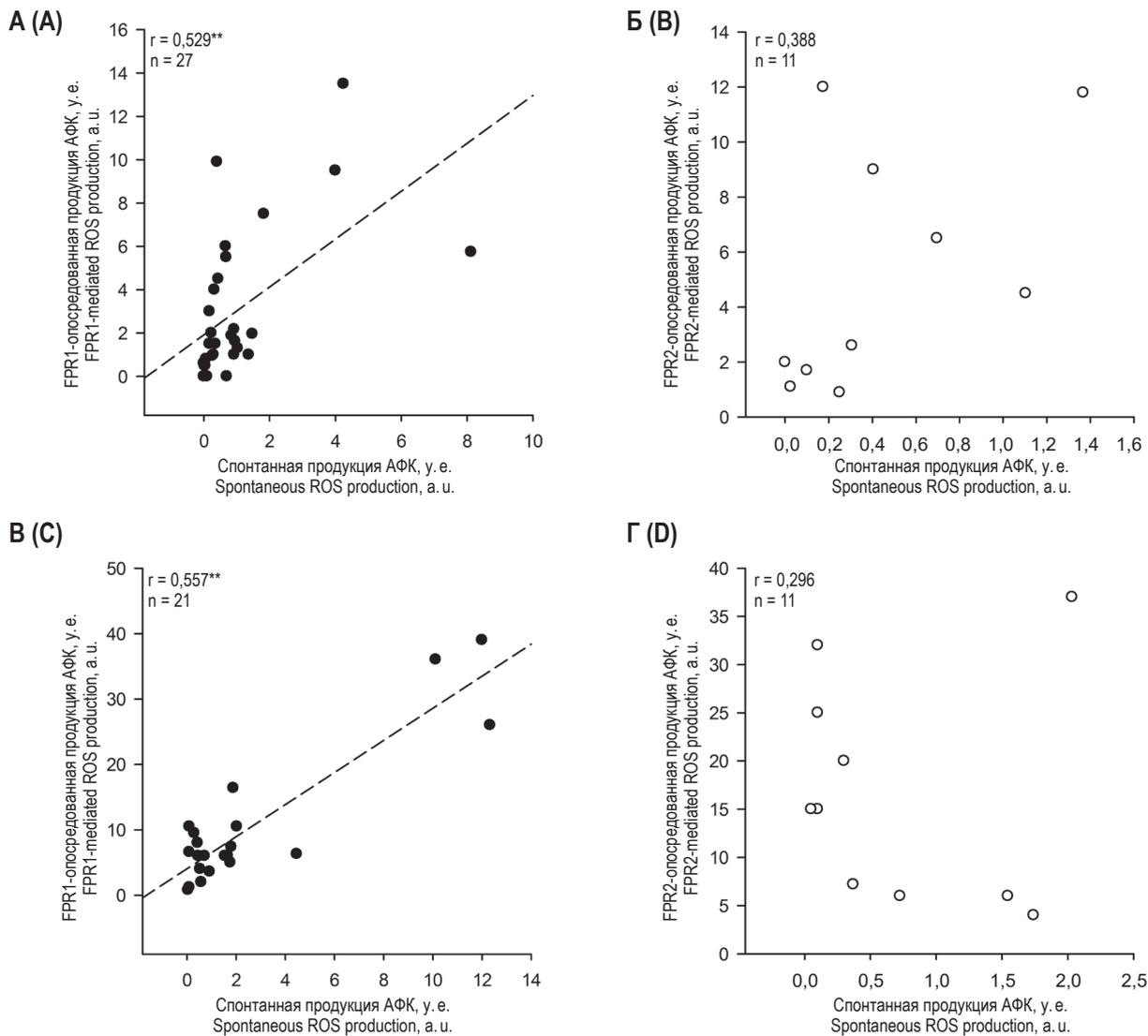


Рисунок 5. Корреляция между спонтанной продукцией АФК и FPR1-опосредованной (правая панель – А, В) или FPR2-опосредованной продукцией АФК (левая панель – Б, Г) в изолированных гранулоцитах крови здоровых добровольцев (ЗД) (верхняя панель – А, Б) и больных РА (РА) (нижняя панель – В, Г)

Примечание. $** - p \leq 0,01$, ранговая корреляция Спирмена.

Figure 5. Correlation between spontaneous ROS generation and FPR1-mediated (right panel – A and C) or FPR2-mediated ROS production (left panel – B and D) in the isolated peripheral blood granulocytes of healthy donors (HD) (upper panel – A and B) and RA patients (RA) (lower panel – C and D)

Note. $** - p \leq 0.01$; Spearman's rank correlation.

Обсуждение

FPR принадлежат к семейству паттерн-распознающих рецепторов, ответственных за связывание формилированных пептидов – продуктов деградации бактериальных и митохондриальных белков [12, 26, 35]. Трансляция белков у прокариот, за исключением архей, инициируется с N-формилметионином, и эта структурная особенность позволяет эукариотическому организму-хозяину распознавать чужеродные белки:

присутствие формилированного метионина является сигналом, указывающим на потенциальную инфекцию. Формилированные пептиды также синтезируются в митохондриях и высвобождаются при повреждении собственных тканей [28].

«Классическая» роль FPR1 связана с хемотаксисом нейтрофилов к очагу инфекции для последующей элиминации микроорганизма при помощи дегрануляции и генерации активных форм кислорода. Однако сейчас известны и другие

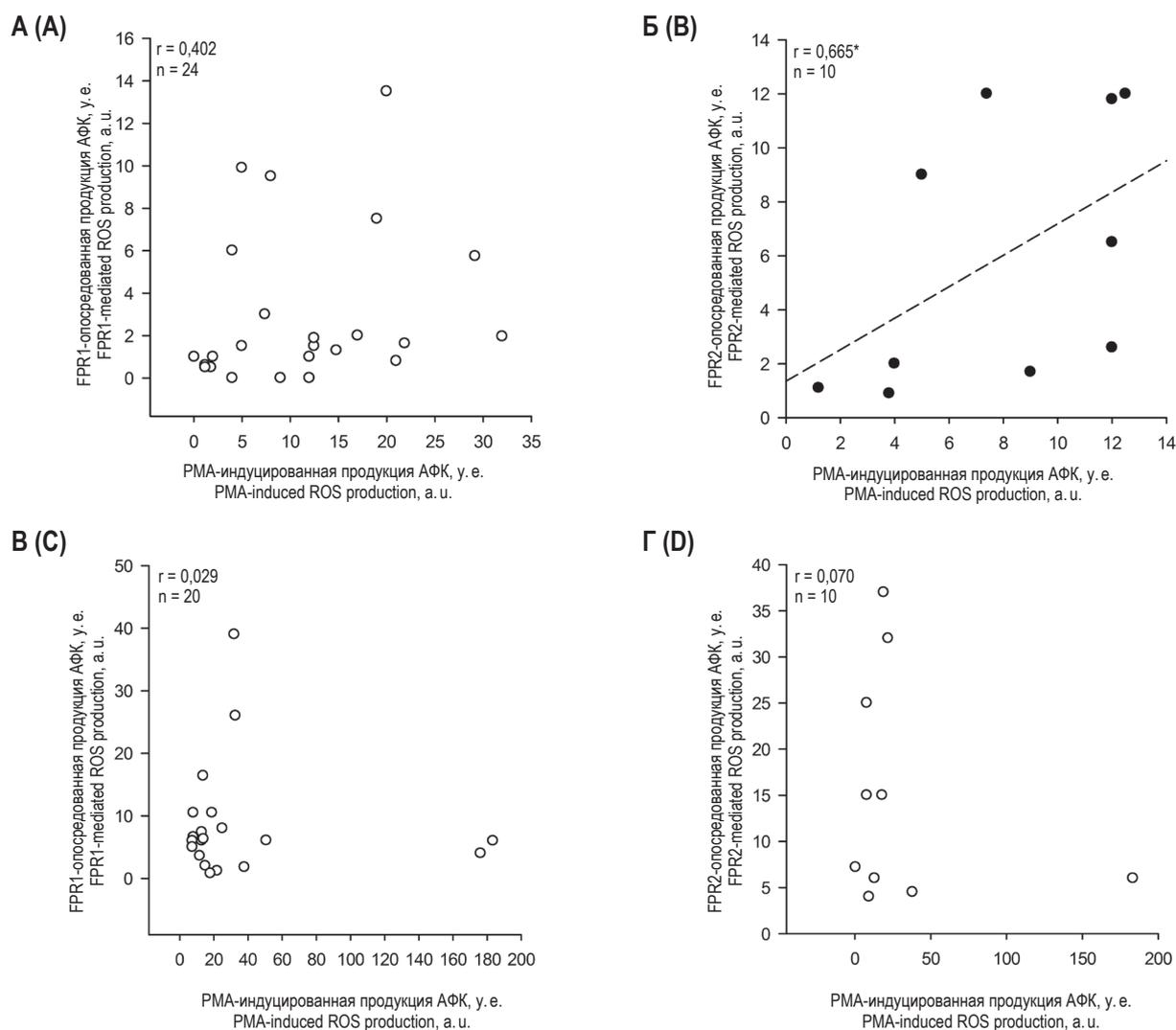


Рисунок 6. Корреляция между PMA-индуцированной и FPR1-опосредованной продукцией АФК (правая панель – А, В) или FPR2-опосредованной продукцией АФК (левая панель – Б, Г) в изолированных гранулоцитах крови здоровых добровольцев (ЗД) (верхняя панель – А, Б) и больных РА (РА) (нижняя панель – В, Г)

Примечание. * – $p \leq 0,05$, ранговая корреляция Спирмена.

Figure 6. Correlation between PMA-induced and FPR1-mediated ROS production (right panel – A and C) or FPR2-mediated ROS production (left panel – C and D) in the isolated peripheral blood granulocytes of healthy donors (HD) (upper panel – A and B) and RA patients (RA) (lower panel – C and D)

Note. *, $p \leq 0.05$; Spearman's rank correlation.

функции FPR1. Например, в изолированных моноцитах человека активация FPR1 усиливает высвобождение IL-8, а также влияет на созревание, миграцию и фенотип дендритных клеток [11]. Также было обнаружено, что fMLF через FPR1 стимулирует активацию тромбоцитов и способствует образованию тромбов в артериях [32]. Недавно Prevet и соавт. обнаружили доказательства защитной роли FPR1 в поддержании целостности эпителия и восстановлении слизистой оболочки после повреждения толстой кишки *in vivo*. Они подтвердили, что формилированные пептиды, высвобождаемые комменсальными бактериями

в толстой кишке, способствуют миграции и пролиферации энтероцитов через FPR1 и НАДФН-оксидазу [27].

FPR2 играет двойную роль во время воспаления. Некоторые лиганды FPR2 запускают воспалительные процессы для устранения инфекции, рекрутирования иммунных клеток и т. д., в то время как другие способствуют инициации противовоспалительных процессов. Эта функциональная двойственность FPR2 изначально определяется природой лигандов. Провоспалительный клеточный ответ активируется бактериальными и митохондриальными формилированными пептидами,

в то время как аннексин А1 (Anx A1) и липоксин А4 (LXA4) индуцируют противовоспалительный ответ [33]. Показано, что переключение между провоспалительными и противовоспалительными клеточными ответами, опосредованными FPR2, связано с конформационными изменениями рецептора при связывании лиганда: связывание противовоспалительных лигандов, таких как Anx A1, вызывает преимущественное образование гомодимеров FPR2/FPR2, что приводит к высвобождению противовоспалительных цитокинов и дифференцировке моноцитов в M2a + M2c-подобные клетки [20]. Воспалительные лиганды, такие как SAA, не вызывают гомодимеризацию рецепторов [8] и могут индуцировать поляризацию макрофагов в подтип M2b или M2d, а также усугубляют инвазию клеток гепатоцеллюлярной карциномы [20].

В соответствии со своей функцией рецепторы формилпептидов играют существенную роль во врожденном иммунитете, отвечая за хемотаксис, дегрануляцию и продукцию АФК. В данной работе мы исследовали возможную роль FPR при ревматоидном артрите, связав рецептор-зависимую продукцию АФК с экспрессией FPR1/FPR2 и РКС-опосредованной активностью НАДФН-оксидазы. Существует несколько возможных взаимосвязей между функцией FPR и развитием и прогрессией РА. Во-первых, это хорошо известная роль FPR в защите хозяина от микробных инфекций, а также увеличение частоты и продолжительности банальных инфекций на ранних стадиях РА [3]. Во-вторых, устойчивая гиперактивированная микробицидная функция может способствовать хроническому воспалению и повреждению тканей.

Мы использовали низкую концентрацию (0,01 мкМ) fMLF для активации FPR1-зависимой продукции АФК и неформилированный синтетический пептид WKYMVM (0,01 мкМ), который преимущественно связывается с FPR2 [13]. Связывание провоспалительных пептидных лигандов активирует внутриклеточный сигнальный путь, который приводит к фосфорилированию субъединиц НАДФН-оксидазы и сборке ферментного комплекса [16], который отвечает за продукцию АФК. В этом исследовании мы использовали продукцию АФК в качестве индикатора функции FPR1 и FPR2 методом люминол-зависимой хемилюминесценции для ее оценки. Мы анализировали амплитуду хемилюминесцентного сигнала в суспензии изолированных гранулоцитов после добавления агонистов fMLF или WKYMVM и обнаружили, что FPR1- и FPR2-

зависимая продукция АФК повышена у пациентов с РА (рис. 2).

Мы предположили, что увеличение продукции FPR-зависимой продукции АФК у пациентов с РА может быть связано с более высоким уровнем экспрессии рецептора, что подтвердилось результатами анализа уровня мРНК FPR1 (рис. 3). Неясно, является ли высокая экспрессия FPR1 врожденной особенностью больных РА или результатом действия внутренних и внешних факторов. На основании данных о более частых и продолжительных инфекциях у больных РА [3], мы считаем более вероятным, что экспрессия FPR1 увеличивается в ответ на присутствие в крови бактериальных лигандов и провоспалительных цитокинов [4].

Циркулирующие нейтрофилы в нормальных гомеостатических условиях находятся в состоянии покоя, но могут переходить в состояние праймирования при воздействии воспалительных агентов, таких как хемокины. Праймирование – приобретение фенотипа «повышенной готовности», обеспечивающего более быструю и агрессивную реакцию на раздражители [30]. Ранее мы показали повышение уровня провоспалительных цитокинов в сыворотке/плазме у больных РА, что позволяет утверждать наличие праймирующих стимулов в крови больных РА [3].

Фосфорилирование субъединиц НАДФН-оксидазы является сигналом для сборки комплекса и респираторного взрыва, а также основным механизмом праймирования. Классическим регулятором активности NOX2 является серин/треониновая протеинкиназа С, активируемая липидными производными [22, 36]. Мы использовали PMA, синтетический аналог диацилглицерина, для стимуляции РКС и анализа РКС-зависимой активации NOX2 у пациентов с РА. Респираторный взрыв, индуцированный PMA, а также базальный уровень продукции АФК были повышены у больных РА, что свидетельствует об активированном состоянии фагоцитарной НАДФН-оксидазы в гранулоцитах крови больных РА (рис. 4).

Хотя изменения в респираторном взрыве, вызванном FPR1 и PMA, были однонаправленными, т. е. оба ответа были повышены у пациентов с РА, мы не обнаружили какой-либо корреляции между продукцией АФК, индуцированной PMA и 0,01 мкМ fMLF в группе РА (рис. 6). Была обнаружена корреляция между ответами, индуцированными PMA и WKYMVM, в здоровой группе, что свидетельствует о том, что FPR2-зависимая активность в большей степени регулируется вну-

триклеточными, а не внеклеточными факторами. Ответ, вызванный FPR1, коррелировал с базовым уровнем активности НАДФН-оксидазы в обеих группах (рис. 5), что предполагает, что предварительная активация (праймирование) более важна для определения интенсивности ответа, опосредованного FPR1. Стоит отметить, что процесс праймирования респираторного взрыва и активации НАДФН-оксидазы не ограничивается активностью PKC, а также поддерживается p38 MAPK и ERK, ROCK, IRAK-4 и другими киназами [6, 9, 10, 25]. Установление вклада киназных каскадов в передачу сигнала FPR1 и FPR2 может объяснить различия в регуляции функции двух типов рецепторов FPR при ревматоидном артрите и определить новые терапевтические мишени.

Заключение

Мы исследовали экспрессию и функцию рецепторов формилированных пептидов в гранулоцитах больных ревматоидным артритом, поскольку эти два рецептора выполняют регуляторную функцию при воспалительных процессах. Повышение уровня спонтанной и индуцированной РМА продукции АФК отражает преактивированное состояние НАДФН-оксидазы в гра-

нулоцитах больных РА. Вместе с более высокой экспрессией FPR1 и повышенным респираторным ответом на агонист FPR1 эти данные позволяют предположить активацию сигнального пути FPR1/PKC/NOX2 в гранулоцитах больных РА. Из-за большего разнообразия сигнальных путей и лигандов FPR2, его вклад в воспаление не столь однозначен и требует дальнейшего изучения. Установление механизмов регуляции сигнальных каскадов FPR1 и FPR2 может выявить новые мишени для противоревматоидной терапии.

Вклад авторов

АМ и ЮВФ внесли равнозначный вклад в эту работу. АМ, АГГ, ЮВФ и МИА: инициация и разработка методологии исследования; МИА: клинические осмотры и отбор участников исследования; АМ, ЮВФ, АГГ, РВЛ: экспериментальная работа; анализ данных – все авторы; АМ: проект рукописи; АГГ, ЮВФ и МИА: финальная коррекция.

Благодарности

Авторы выражают благодарность сотрудникам НИЛ OpenLab «Генные и клеточные технологии» Казанского федерального университета за техническую и научную поддержку.

Список литературы / References

1. Ahmed M., Kim D.R. pcr: an R package for quality assessment, analysis and testing of qPCR data. *PeerJ*, 2018, Vol. 6, e4473. doi: 10.7717/peerj.4473.
2. Aletaha D., Neogi T., Silman A.J., Funovits J., Felson D.T., Bingham C.O., 3rd, Birnbaum N.S., Burmester G.R., Bykerk V.P., Cohen M.D., Combe B., Costenbader K.H., Dougados M., Emery P., Ferraccioli G., Hazes J.M., Hobbs K., Huizinga T.W.J., Kavanaugh A., Kay J., Kvien T.K., Laing T., Mease P., Menard H.A., Moreland L.W., Naden R.L., Pincus T., Smolen J.S., Stanislawski-Biernat E., Symmons D., Tak P. P., Upchurch K.S., Vencovsky J., Wolfe F., Hawker G. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.*, 2010, Vol. 62, no. 9, pp. 2569-2581.
3. Arleevskaya M. I., Gabdoulkhakova A.G., Filina Y.V., Miftakhova R.R., Bredberg A., Tsybulkin A.P. A transient peak of infections during onset of rheumatoid arthritis: a 10-year prospective cohort study. *BMJ Open*, 2014, Vol. 4, no. 8, e005254. doi: 10.1136/bmjopen-2014-005254.
4. Arleevskaya M.I., Shafigullina A.Z., Filina Y.V., Lemerle J., Renaudineau Y. Associations between viral infection history symptoms, granulocyte reactive oxygen species activity, and active rheumatoid arthritis disease in untreated women at onset: results from a longitudinal cohort study of Tatarstan women. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 1725. doi: 10.3389/fimmu.2017.01725.
5. Arterburn J.B., Oprea T.I., Prossnitz E.R., Edwards B.S., Sklar L.A. Discovery of selective probes and antagonists for G-protein-coupled receptors FPR/FPRL1 and GPR30. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2009, Vol. 9, no. 13, pp. 1227-1236.
6. Cap K.C., Kim J.G., Hamza A., Park J.B. P-Tyr42 RhoA GTPase amplifies superoxide formation through p47phox, phosphorylated by ROCK. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2020, Vol. 523, no. 4, pp. 972-978.
7. Chen K., Le Y., Liu Y., Gong W., Ying G., Huang J., Yoshimura T., Tessarollo L., Wang J.M. A critical role for the G protein-coupled receptor mFPR2 in airway inflammation and immune responses. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 184, no. 7, pp. 3331-3335.
8. Cooray S.N., Gobetti T., Montero-Melendez T., McArthur S., Thompson D., Clark A.J., Flower R.J., Perretti M. Ligand-specific conformational change of the G-protein-coupled receptor ALX/FPR2 determines proresolving functional responses. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 2013, Vol. 110, no. 45, pp. 18232-18237.

9. Dang P.M., Stensballe A., Boussetta T., Raad H., Dewas C., Kroviarski Y., Hayem G., Jensen O.N., Gougerot-Pocidal M.A., El-Benna J. A specific p47phox -serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites. *J. Clin. Invest.*, 2006, Vol. 116, no. 7, pp. 2033-2043.
10. Dewas C., Dang P.M., Gougerot-Pocidal M.A., El-Benna J. TNF-alpha induces phosphorylation of p47(phox) in human neutrophils: partial phosphorylation of p47phox is a common event of priming of human neutrophils by TNF-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Immunol.*, 2003, Vol. 171, no. 8, pp. 4392-4398.
11. Dorward D.A., Lucas C.D., Chapman G.B., Haslett C., Dhaliwal K., Rossi A.G. The role of formylated peptides and formyl peptide receptor 1 in governing neutrophil function during acute inflammation. *Am. J. Pathol.*, 2015, Vol. 185, no. 5, pp. 1172-1184.
12. Fu H., Bjorkman L., Janmey P., Karlsson A., Karlsson J., Movitz C., Dahlgren C. The two neutrophil members of the formylpeptide receptor family activate the NADPH-oxidase through signals that differ in sensitivity to a gelsolin derived phosphoinositide-binding peptide. *BMC Cell Biol.*, 2004, Vol. 5, no. 1, 50. doi: 10.1186/1471-2121-5-50.
13. He H.Q., Troksa E.L., Caltabiano G., Pardo L., Ye R.D. Structural determinants for the interaction of formyl peptide receptor 2 with peptide ligands. *J. Biol. Chem.*, 2014, Vol. 289, no. 4, pp. 2295-2306.
14. He H.Q., Ye R.D. The formyl peptide receptors: diversity of ligands and mechanism for recognition. *Molecules*, 2017, Vol. 22, no. 3, 455. doi: 10.3390/molecules22030455.
15. Jazayeri A., Dias J.M., Marshall F.H. From G protein-coupled receptor structure resolution to rational drug design. *J. Biol. Chem.*, 2015, Vol. 290, no. 32, pp. 19489-19495.
16. Karimi G., Houee Levin C., Dagher M.C., Baciou L., Bizouarn T. Assembly of phagocyte NADPH oxidase: A concerted binding process? *Biochim. Biophys. Acta*, 2014, Vol. 1840, no. 11, pp. 3277-3283.
17. Le Y., Oppenheim J.J., Wang J.M. Pleiotropic roles of formyl peptide receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2001, Vol. 12, no. 1, pp. 91-105.
18. Lee H.Y., Lee M., Bae Y.S. Formyl peptide receptors in cellular differentiation and inflammatory diseases. *J. Cell. Biochem.*, 2017, Vol. 118, no. 6, pp. 1300-1307.
19. Lee M.-S., Yoo S.-A., Cho C.-S., Suh P.-G., Kim W.-U., Ryu S.H. Serum amyloid A binding to formyl peptide receptor-like 1 induces synovial hyperplasia and angiogenesis. *J. Immunol.*, 2006, Vol. 177, no. 8, pp. 5585-5594.
20. Li Y., Cai L., Wang H., Wu P., Gu W., Chen Y., Hao H., Tang K., Yi P., Liu M. Pleiotropic regulation of macrophage polarization and tumorigenesis by formyl peptide receptor-2. *Oncogene*, 2011, Vol. 30, no. 36, pp. 3887-3899.
21. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001, Vol. 25, no. 4, pp. 402-408.
22. Nauseef W.M., Volpp B.D., McCormick S., Leidal K.G., Clark R.A. Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase. Protein kinase C promotes cytoskeletal and membrane association of cytosolic oxidase components. *J. Biol. Chem.*, 1991, Vol. 266, no. 9, pp. 5911-5917.
23. Odobasic D., Jia Y., Kao W., Fan H., Wei X., Gu R., Ngo D., Kitching A.R., Holdsworth S.R., Morand E.F. Formyl peptide receptor activation inhibits the expansion of effector T cells and synovial fibroblasts and attenuates joint injury in models of rheumatoid arthritis. *Int. Immunopharmacol.*, 2018, Vol. 61, pp. 140-149.
24. O'Hara R., Murphy E.P., Whitehead A.S., FitzGerald O., Bresnihan B. Local expression of the serum amyloid A and formyl peptide receptor-like 1 genes in synovial tissue is associated with matrix metalloproteinase production in patients with inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2004, Vol. 50, no. 6, pp. 1788-1799.
25. Pacquelet S., Johnson J.L., Ellis B.A., Brzezinska A.A., Lane W.S., Munafo D.B., Catz S.D. Cross-talk between IRAK-4 and the NADPH oxidase. *Biochem. J.*, 2007, Vol. 403, no. 3, pp. 451-461.
26. Panaro M.A., Acquafredda A., Sisto M., Lisi S., Maffione A.B., Mitolo V. Biological role of the N-formyl peptide receptors. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 2006, Vol. 28, no. 1, pp. 103-127.
27. Prevece N., Liotti F., Marone G., Melillo R.M., de Paulis A. Formyl peptide receptors at the interface of inflammation, angiogenesis and tumor growth. *Pharmacol. Res.*, 2015, Vol. 102, pp. 184-191.
28. Raabe C.A., Groper J., Rescher U. Biased perspectives on formyl peptide receptors. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, 2019, Vol. 1866, no. 2, pp. 305-316.
29. Richard D.Y., Boulay F., Wang J.M., Dahlgren C., Gerard C., Parmentier M., Serhan C.N., Murphy P.M. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family. *Pharmacol. Rev.*, 2009, Vol. 61, no. 2, pp. 119-161.
30. Safronova V.G., Gabdoulkhakova A.G., Miller A.V., Kosarev I.V., Vasilenko R. N. Variations of the effect of insulin on neutrophil respiratory burst. The role of tyrosine kinases and phosphatases. *Biochemistry (Mosc.)*, 2001, Vol. 66, no. 8, pp. 840-849.

31. Safronova V.G., Gabdoulkhakova A.G., Santalov B.F. Immunomodulating action of low intensity millimeter waves on primed neutrophils. *Bioelectromagnetics*, 2002, Vol. 23, no. 8, pp. 599-606.
32. Salamah M.F., Ravishankar D., Vaiyapuri R., Moraes L.A., Patel K., Perretti M., Gibbins J.M., Vaiyapuri S. The formyl peptide fMLF primes platelet activation and augments thrombus formation. *J. Thromb. Haemost.*, 2019, Vol. 17, no. 7, pp. 1120-1133
33. Stama M.L., Ślusarczyk J., Lacivita E., Kirpotina L.N., Schepetkin I.A., Chamera K., Riganti C., Perrone R., Quinn M.T., Basta-Kaim A. Novel ureidopropanamide based N-formyl peptide receptor 2 (FPR2) agonists with potential application for central nervous system disorders characterized by neuroinflammation. *Eur. J. Med. Chem.*, 2017, Vol. 141, pp. 703-720.
34. Uhlen M., Fagerberg L., Hallstrom B.M., Lindskog C., Oksvold P., Mardinoglu A., Sivertsson A., Kampf C., Sjostedt E., Asplund A., Olsson I., Edlund K., Lundberg E., Navani S., Szigartyo C.A., Odeberg J., Djureinovic D., Takanen J.O., Hober S., Alm T., Edqvist P.H., Berling H., Tegel H., Mulder J., Rockberg J., Nilsson P., Schwenk J.M., Hamsten M., von Feilitzen K., Forsberg M., Persson L., Johansson F., Zwahlen M., von Heijne G., Nielsen J., Ponten F. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*, 2015, Vol. 347, no. 6220, 1260419. doi: 10.1126/science.1260419.
35. Wittmann S., Frohlich D., Daniels S. Characterization of the human fMLP receptor in neutrophils and in *Xenopus* oocytes. *Br. J. Pharmacol.*, 2002, Vol. 135, no. 6, pp. 1375-1382.
36. Xia N., Tenzer S., Lunov O., Karl M., Simmet T., Daiber A., Munzel T., Reifenberg G., Forstermann U., Li H. Regulation of NADPH Oxidase-Mediated Superoxide Production by Acetylation and Deacetylation. *Front. Physiol.*, 2021, Vol. 12, 693702. doi: 10.3389/fphys.2021.693702.
37. Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T.L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 2012, Vol. 13, 134. doi: 10.1186/1471-2105-13-134.

Авторы:

Мохаммад Аффра – аспирант лаборатории геномной инженерии ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», г. Долгопрудный, Московская обл., Россия

Филина Ю.В. – научный сотрудник OpenLab «Генные и клеточные технологии» ИФМиБ ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Ларионова Р.В. – научный сотрудник Казанской государственной медицинской академии – филиала ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Арлеевская М.И. – к.м.н., старший научный сотрудник Казанской государственной медицинской академии – филиала ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Габдулхакова А.Г. – к.б.н., старший научный сотрудник ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»; старший научный сотрудник Казанской государственной медицинской академии – филиала ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Authors:

Mohammad Afraa, Postgraduate Student, Laboratory of Genomic Engineering, Moscow Physico-Technical Institute, Dolgoprudny, Moscow Region, Russian Federation

Filina Yu.V., Research Associate, Open Laboratory of Gene and Cell Technologies, Kazan Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Larionova R.V., Research Associate, Kazan State Medical Academy, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Arleevskaya M.I., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Kazan State Medical Academy, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Gabdulhakova A.G., PhD (Biology), Senior Research Associate, Kazan Federal University; Senior Research Associate, Kazan State Medical Academy, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Поступила 12.04.2022

Отправлена на доработку 22.05.2022

Принята к печати 27.05.2022

Received 12.04.2022

Revision received 22.05.2022

Accepted 27.05.2022