

ВЛИЯНИЕ БЕЛКА RUBICON НА ПРОТЕКАНИЕ LC3-АССОЦИИРОВАННОГО ФАГОЦИТОЗА В МОНОЦИТАХ БОЛЬНЫХ ТЯЖЕЛОЙ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Ибрагимов Б.Р.¹, Скибо Ю.В.¹, Решетникова И.Д.^{1,2}, Абрамов С.Н.¹,
Даминова А.Г.¹, Евтюгин В.Г.¹, Абрамова З.И.¹

¹ ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

² ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора, г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Резюме. Атопическая бронхиальная астма является наиболее частым и тяжелым аллергическим заболеванием среди широкого спектра подобных болезней. Основной патогенез этого заболевания характеризуется нарушением гомеостаза Т-лимфоцитов, что значительно ухудшает общее состояние здоровья.

При атопической бронхиальной астме происходит нарушение процесса апоптоза Т-клеток. Это влечет за собой нарушение регуляции и поддержания гомеостаза периферических лимфоцитов. В нормальном состоянии организма Т-клетки должны подвергаться апоптозу, а его продукты должны утилизироваться соседними клетками или профессиональными фагоцитами: моноцитами, макрофагами или дендритными клетками. Этот процесс нарушается при атопической бронхиальной астме.

Нарушение иммунной системы, такие как аутоиммунитет, часто возникают из-за неправильной регуляции апоптоза лимфоцитов. Это особенно актуально в случаях, когда происходит недостаточный клиренс апоптотических телец или даже его полное отсутствие.

В последние годы в научном и медицинском сообществах большое внимание обращено к такой форме фагоцитоза, как эффероцитоз. Это процесс, при котором апоптотические клетки удаляются фагоцитарными клетками путем LC3-ассоциированного фагоцитоза (LAP).

Данный процесс инициирует поглощение за счет взаимодействий рецепторов плазматической мембраны фагоцита с апоптотической клеткой. Далее в клетке при участии определенных белков аутофагии (Beclin-1, VPS34, UVRAG, ATG5, ATG12, ATG7, ATG4, LC3) формируется одномембранная фагосома. Фагосома обогащается молекулами LC3 белка и сливается с лизосомой, в которой затем происходит лизис захваченного «груза».

Адрес для переписки:

Ибрагимов Булат Рафисович
Институт фундаментальной медицины и биологии
ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»
420008, Россия, Республика Татарстан, г. Казань,
ул. Кремлевская, 18.
Тел.: 8 (999) 132-70-75.
E-mail: ibragimov94@inbox.ru

Address for correspondence:

Bulat R. Ibragimov
Institute of Fundamental Medicine and Biology,
Kazan (Volga Region) Federal University
18 Kremlevskaya St
Kazan, Republic of Tatarstan
420008 Russian Federation
Phone: +7 (999) 132-70-75.
E-mail: ibragimov94@inbox.ru

Образец цитирования:

Б.Р. Ибрагимов, Ю.В. Скибо, И.Д. Решетникова,
С.Н. Абрамов, А.Г. Даминова, В.Г. Евтюгин,
З.И. Абрамова «Влияние белка Rubicon на протекание
LC3-ассоциированного фагоцитоза в моноцитах
больных тяжелой атопической бронхиальной астмой»
// Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 6.
С. 1213-1222. doi: 10.15789/1563-0625-EOT-2868

© Ибрагимов Б.Р. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

B.R. Ibragimov, Yu.V. Skibo, I.D. Reshetnikova,
S.N. Abramov, A.G. Daminova, V.G. Evtyugin, Z.I. Abramova
“Effect of the Rubicon protein on LC3-associated phagocytosis
by monocytes in the patients with severe atopic bronchial
asthma”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 6, pp. 1213-1222.
doi: 10.15789/1563-0625-EOT-2868

© Ibragimov B.R. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-EOT-2868

В рамках нашей работы был проведен подробный анализ содержания некоторых ключевых белков LAP-пути в моноцитах периферической крови больных бронхиальной астмой тяжелого течения. Было обнаружено, что экспрессия белка Rubicon повышена, что позволяет заключить, что в моноцитах здоровых доноров активируется LAP-путь, по которому происходит фагоцитоз погибающих Т-клеток.

В то же время в моноцитах больных тяжелой формой atopической астмы активируются компоненты, характерные как для аутофагии, так и для LC3-ассоциированного фагоцитоза. Однако стоит отметить, что достоверно установлено снижение экспрессии белка Rubicon, предполагаемого маркера LC3-ассоциированного фагоцитоза.

Ключевые слова: Rubicon, LC3-ассоциированный фагоцитоз, аутофагия, моноциты, atopическая бронхиальная астма, LC3

EFFECT OF THE RUBICON PROTEIN ON LC3-ASSOCIATED PHAGOCYTOSIS BY MONOCYTES IN THE PATIENTS WITH SEVERE ATOPIC BRONCHIAL ASTHMA

Ibragimov B.R.^a, Skibo Yu.V.^a, Reshetnikova I.D.^{a, b}, Abramov S.N.^a,
Daminova A.G.^a, Evtyugin V.G.^a, Abramova Z.I.^a

^a Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

^b Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Abstract. Atopic bronchial asthma is the most common and severe allergic disease among a wide range of similar diseases. The main pathogenesis of this disease is characterized by a disturbance of T lymphocyte homeostasis, which significantly worsens the general state of health. In atopic bronchial asthma, there is impaired process of T cell apoptosis. This entails dysregulation and maintenance of peripheral lymphocyte homeostasis. Normally, T cells must undergo apoptosis, and its products should be utilized by neighboring cells, or professional phagocytes: monocytes, macrophages, or dendritic cells. This process is altered in atopic bronchial asthma. The immune system disorders, such as autoimmunity, often result from dysregulation of lymphocyte apoptosis. This is especially true in cases of insufficient or missed clearance of apoptotic bodies.

Recently, the research and medical communities pay much attention to efferocytosis, a form of phagocytosis which proceeds by removal of apoptotic cells by phagocytes by means of LC3-associated phagocytosis (LAP). This process initiates uptake of the particles due to interactions between the phagocyte plasma membrane receptors and apoptotic cell. Further on, a single-membrane phagosome is formed in the cell with the participation of certain autophagy proteins (Beclin-1, VPS34, UVRAG, ATG5, ATG12, ATG7, ATG4, ATG4, LC3). The phagosome is enriched with LC3 protein molecules and fused with lysosomes, in which the captured “cargo” is then lysed. As a part of our work, a detailed analysis of some key protein contents at the LAP pathway was carried out for peripheral blood monocytes of patients with severe bronchial asthma. It was found that the expression of *Rubicon* protein is increased, thus allowing to conclude that the LAP pathway is activated in monocytes of healthy donors, thus allowing phagocytosis of dying T cells. At the same time, the components characteristic of both autophagy and LC3-associated phagocytosis are activated in the monocytes of patients with severe atopical asthma. However, one should note that decreased expression of the *Rubicon* protein, a putative marker of LC3-associated phagocytosis, has been clearly confirmed.

Keywords: Rubicon protein, phagocytosis, LC3-associated, autophagy, monocytes, atopical bronchial asthma, LC3

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров (Приоритет – 2030).

Введение

Бронхиальная астма по этиологии возникновения подразделяется на неаллергическую БА (аспириновая БА) и аллергическую (атопическая – IgE-обусловленная БА, неатопическая – HelgE-обусловленная БА).

Предполагается, что в патогенезе atopической бронхиальной астмы существенную роль играет нарушение клиренса погибших Т-клеток. С ослаблением апоптоза Т-лимфоцитов и запуском аутофагии в этих клетках связывают развитие ряда аутоиммунных процессов [3, 5, 21]. Заключительным этапом апоптоза является поглощение апоптотических телец фагоцитирующими клетками. Данный процесс принято называть эффероцитозом, осуществляющимся путем LC3-ассоциированного фагоцитоза (рис. 1) [2, 9, 11, 14, 26]. Накопление апоптотических телец в организме приводит к увеличению аутоантигенов, а затем и к аутоиммунному ответу [4, 6].

LAP функционирует при поглощении умирающих клеток, а нарушение его активности способствует волчаноподобному состоянию [12, 27].

LAP был описан еще в 2007 году [35]. Это форма фагоцитоза, при котором рецепторами плазматической мембраны фагоцита происходит распознавание, захват и поглощение апоптотических телец, бактериальных и некротических клеток. Затем в фагоците при участии определенных белков аутофагии (Beclin-1, VPS34, UVRAG, ATG5, ATG12, ATG7, ATG4, LC3) формируется одномембранная фагосома. Фагосома обогащается молекулами LC3 белка и сливается с лизосомой, в которой впоследствии происходит лизис захваченного «груза» [26].

Несмотря на совместное использование некоторых молекулярных механизмов, существуют различия, которые дифференцируют LAP от канонической аутофагии.

На биохимическом уровне отличие аутофагии от LAP заключается в первую очередь преиницирующими белками. При аутофагии это белки ULK 1 и ATG14, а при LAP – Rubicon и NOX2. В зависимости от преинициаторных белков на последней стадии синтезируется аутофаголизосома (двухмембранная органелла) или лапосома (одномембранная органелла). Тем не менее процессы канонической аутофагии и неканонической аутофагии протекают по схожему механизму, при участии белков: Beclin-1, VPS34, UVRAG, ATG5, ATG12, ATG16L, ATG7, ATG3, ATG4 и семейство LC3-белков.

LC3-ассоциированный фагоцитоз включает конъюгацию белка LC3 с одиночными органеллами (лапосомами). В то время как в канонической аутофагии происходит конъюгация LC3 белка с двойными мембранными структурами. Начальным этапом аутофагии является окружение белков или органелл, требующих утилизации, единой изолирующей мембраной. Слияние краев мембранного мешка друг с другом образует замкнутую двухмембранную структуру, так называемую аутофагосому, или незрелую аутофагическую вакуоль. Наконец, аутофагосома сливается с лизосомой, становясь аутолизосомой или деградирующей аутофагической вакуолью. LC3-ассоциированный фагоцитоз протекает по схожему механизму: захват «груза», слияние с лизосомой. Тем не менее при LAP органелла с поглотившим грузом имеет одномембранную структуру [16, 17]. Это структурное различие четко определяет протекание процесса либо кано-

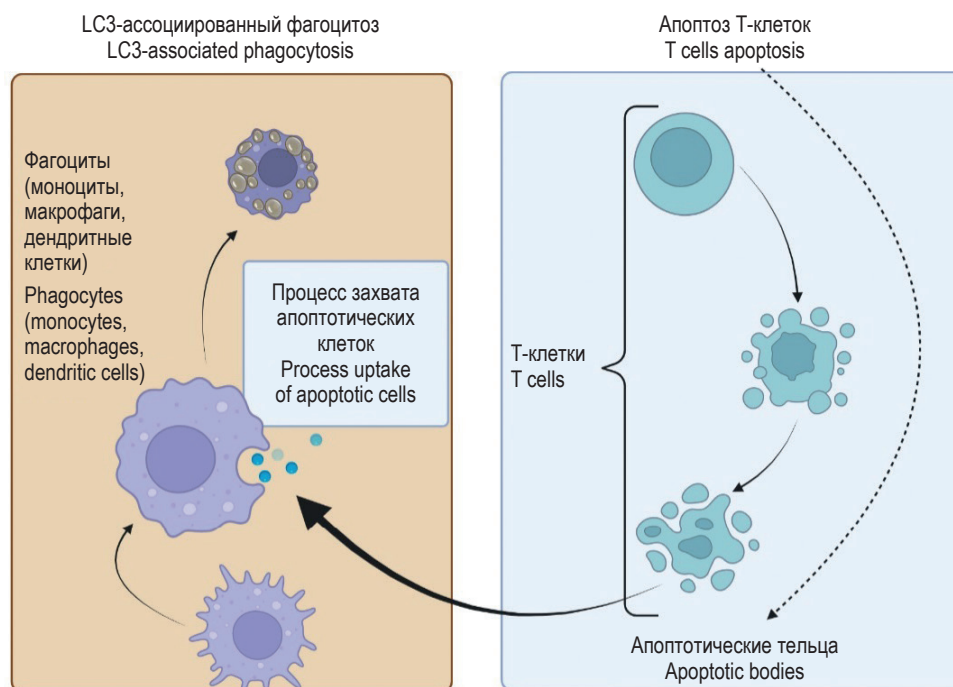


Рисунок 1. Клеточный гомеостаз иммунных клеток [27]

Figure 1. Cellular homeostasis of immune cells [27]

нической аутофагии, либо неканонической формы аутофагии (LAP).

В последнее десятилетие фагоцитоз мертвых или умирающих клеток подробно изучался на уровне осуществляющих этот процесс белков [20, 24, 33]. Белок Rubicon первоначально был идентифицирован как компонент комплекса PI3K III класса и негативного регулятора канонической аутофагии (ингибитор белка Beclin-1) [30, 40], а позже было показано, что Rubicon участвует в созревании эндосом [36, 37]. Также известно, что Rubicon привлекает НАДФН-оксидазы для участия в защите от бактерий [23, 38]. Далее выяснилось, что Rubicon участвует в специфическом типе клеточного поглощения внеклеточного содержимого, называемом LC3-ассоциированным фагоцитозом (LAP) [11, 15, 18, 25]. Этот процесс считается критически важным для удаления некротического и апоптотического мусора и может иметь решающее значение для регенерации тканей после острого повреждения, избегая при этом аутоиммунитета [31].

Целью данного исследования был анализ экспрессии ключевых белков LC3-ассоциированного фагоцитоза в моноцитах больных бронхиальной астмой тяжелого течения.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования были использованы моноциты периферической крови здоровых доноров и больных atopической бронхиальной астмой. В группу тяжелой бронхиальной астмы вошли 15 больных.

Контрольную группу составили 15 здоровых человек в возрасте от 20 до 34 лет (средний возраст 27 ± 7 лет), не имевших отягощенного аллергологического анамнеза.

Моноциты выделяли центрифугированием в градиенте плотности фиколл ($\rho = 1,077$) (НПП «ПанЭко», Россия), с последующим центрифугированием в 46% осмотическом градиенте плотности Перколл (Percoll plus 11, GE Healthcare). Подсчет клеток проводили в камере Нойбауэра (Counting Chamber with Bright Line Double Net Ruling, Marienfeld Superior).

Наблюдение за ультраструктурой моноцитов в каждой группе проводили методом трансмиссионной электронной микроскопии. Клетки фиксировали в 2,5% глutarовом альдегиде, приготовленного на фосфатном буфере (0,1 М, pH 7,4). Образцы промывали фосфатным буфером 3 раза по 15 минут. Постфиксацию проводили 1% четырехокисью осмия. Затем обезвоживали в этаноле в восходящем ряду (30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96% и 100%) и выдерживали в ацетоне три раза по 20 минут. Далее образцы инкубировали 2 раза по 30 минут в окиси пропилену и проводили пропитывание смесью эпоксидных смол ЭПОН с окисью пропилену по 24 часа в следующих соотношениях: 1) 1:2; 2) 1:1; 3) 2:1. Затем

материал помещали в чистую смолу. Полимеризацию проводили при температурах 37 °C, 45 °C и 62 °C в течение 24 часов. Ультратонкие срезы (50 нм — 60 нм) получали на микротоме Leica (Германия) и окрашивали 20 минут насыщенным водным раствором 2%-ного уранилацетата и 5 минут 0,4%-ным цитратом свинца [34]. Ультраструктуру органелл, участвующих в аутофагии и LC3-ассоциированном фагоцитозе, наблюдали и фотографировали в HR-ТЕМ режиме на просвечивающем электронном микроскопе (ПЭМ) Hitachi HT 7700 Excellence при ускоряющем напряжении 100 кэВ с разрешением 0,144 нм [7, 8, 10, 13, 32, 39]. Микроскопию проводили в Междисциплинарном центре «Аналитическая микроскопия» (Казанский федеральный университет, г. Казань, Республика Татарстан, Россия).

Анализ ключевых белков регуляторов аутофагии и LC3-ассоциированного фагоцитоза проводили методом Вестерн-блот анализа. Определение концентрации белка в образцах проводили с использованием набора BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, США). Белки инкубировали последовательно с первичными и вторичными антителами и визуализировали с применением ECL-набора на основе хемилюминесцентного субстрата (Bio-Rad, США). Были использованы такие первичные антитела, как антитела мыши к Bcl-2 (Invitrogen, США), антитела кролика к Vps34, антитела мыши к Beclin-1 (Invitrogen, США), антитела к Rubicon (Invitrogen, США), Uvrag (Invitrogen, США), LC3 (Cell Signaling Technology, США), антитела к GABDH (Invitrogen, США). В качестве вторичных антител использовались мышиные и кроличьи антитела конъюгированные с пероксидазой хрена (Thermo Fisher Scientific, США). В качестве белкового маркера применяли MagikMark XP (Invitrogen, Molecular Probes, США) и Page Ruler (Thermo Fisher Scientific, США).

Для статистической обработки данных использовали программную среду вычислений GraphPad Prism — 8 (GraphPad Software, Inc., США). Серединные значения набора чисел (медиана выборки) не совпадали со средними значениями выборки. Нормальность распределения проверяли с помощью теста Шапиро—Уилка. Для сравнения двух групп использовали R-функцию теста Уилкоксона (критерий Манна—Уитни—Уилкоксона). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез о существовании различий показателей между группами принят равным 0,05 ($p\text{-value} \leq 0,05$). Корреляционный анализ был выполнен методом Спирмена.

Результаты

Первичный анализ популяций лейкоцитов проводили с помощью диаграммы прямого — бокового светорассеяния (SS — FS). Результаты

цитометрических исследований (рис. 2), а также микрофотографии флуоресцентной микроскопии (рис. 3) подтвердили наличие белка CD14 в клетках, выделенных из периферической крови, после очистки на градиенте плотности Фиколла с последующей очисткой в градиенте Перколл. Это свидетельствует о том, что данная субпопуляция клеток, содержит моноциты. Чистота и извлечение моноцитов составила около 70% (рис. 2).

В образцах здоровых доноров методом трансмиссионной электронной микроскопии были обнаружены одномембранные структуры харак-

терные для процесса LC3-ассоциированного фагоцитоза (лапосомы). Размеры лапосом в клетках здоровых доноров достигали 13 мкм в диаметре, а размеры аутофагосом в клетках больных варьировались в диапазоне 6-6,5 мкм (рис. 4).

Сравнительный анализ ключевых белков апоптоза методом Вестерн-блот анализа выявил сниженную экспрессию апоптотического белка Caspase-3 (Cas-3) в моноцитах больных тяжелой формы atopической бронхиальной астмы на фоне здоровых пациентов. Bcl-2 белок, который ингибирует протекание апоптоза, что приводит к дальнейшему функционированию клетки.

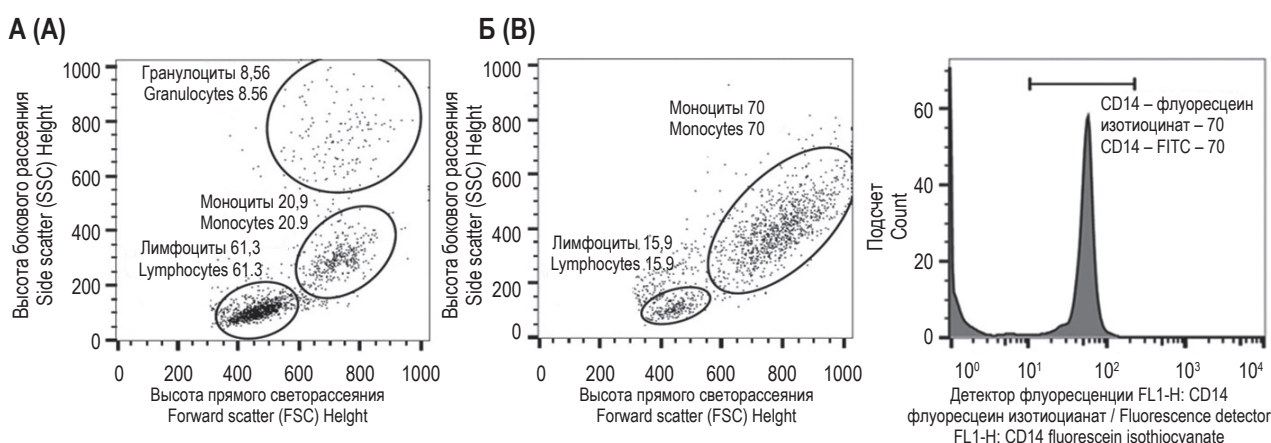


Рисунок 2. Этапы выделения моноцитов

Примечание. А – состав мононуклеарных клеток периферической крови, выделенных на градиенте плотности Фиколла (моноцитов 20,9%). Б – состав мононуклеарных клеток периферической крови, после очистки на градиенте плотности перколл (70,0%).

Figure 2. Stages of monocyte isolation

Note. A, composition of peripheral blood mononuclear cells isolated on the Ficoll density gradient (monocytes 20.9%). B, composition of peripheral blood mononuclear cells after purification on the Percoll density gradient (70.0%).

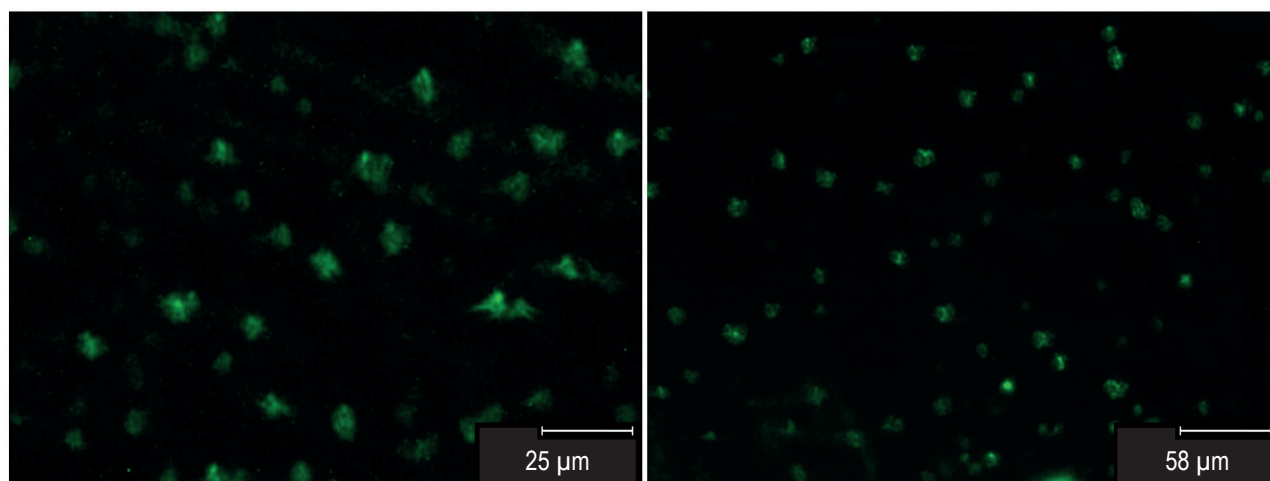


Рисунок 3. Микрофотография флуоресцентной микроскопии (увеличение 20×)

Примечание. Субпопуляция моноцитов периферической крови после очистки на градиенте плотности перколл, окрашенная моноклональными антителами к CD14, конъюгированные FITS. Репрезентативный результат.

Figure 3. Fluorescence micrograph (magnification 20×)

Note. A subpopulation of peripheral blood monocytes after purification on a Percoll density gradient, stained with anti-CD14 monoclonal antibodies conjugated with FITS. Representative result.

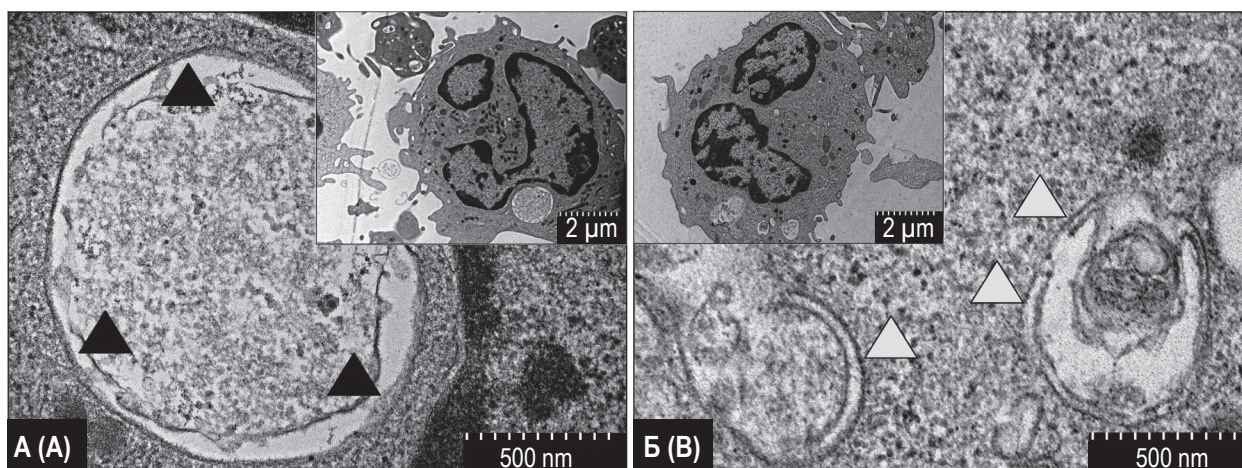


Рисунок 4. Структурное сравнение лапосом – LC3-ассоциированный фагоцитоз (А – черная стрелка) – моноцитов от здоровых доноров и аутофаголизосом – аутофагии (Б – белая стрелка) моноцитов от больных тяжелой атопической бронхиальной астмой

Figure 4. Structural comparison of laposomes – LC3-associated phagocytosis (A, black arrow) – monocytes from healthy donors, and autophagolysosomes – Autophagy (B, white arrow) of monocytes from patients with severe atopic bronchial asthma

Активацию канонической и неканонической аутофагии оценивали по экспрессии ключевых белков аутофагии. Результаты из рисунка 5 показали, что в моноцитах здоровых доноров маркерный белок аутофагии присутствует в форме LC3-I, которая находится в цитоплазме. LC3-I является цитозольным, тогда как LC3-II связан с мембраной. LC3-II, стандартный маркер аутофагосом, образуется путем конъюгации цитозольного LC3-I с фосфатидилэтаноламином (PE) на поверхности зарождающихся аутофагосом. В связи с этим, соотношение LC3-I/LC3-II говорит о завершенности или о незавершенности аутофагии. В группе с тяжелой формой АБА мы наблюдали более высокую экспрессию LC3-II в клетках.

У здоровых доноров наблюдается повышение белка Rubicon – негативного регулятора аутофагии. Rubicon является ключевым белком LC3-ассоциированного фагоцитоза, и используется в качестве маркера протекания процесса.

Анализ белков Rubicon и Uvrag выявил в образцах больных тяжелой формой АБА низкую экспрессию, в то время как в образцах здоровых доноров экспрессия белков LC3-ассоциированного фагоцитоза была выше, чем у больных. Это говорит о том, что механизм LC3-ассоциированного фагоцитоза в моноцитах больных АБА тяжелой формы запускается реже, или нарушен.

Ген *Beclin1* (ATG 6) играет ключевую роль в канонической аутофагии, выполняющий роль одного из инициаторов механизма. В образцах

моноцитов АБА было обнаружено не значительное повышение белка Beclin-1.

Обсуждение

Считается, что среди различных форм клеточной гибели каспазо-зависимый апоптоз отвечает за большую часть гомеостатического клеточного отбора. Апоптоз характеризуется округлением и сморщиванием клеток, конденсацией хроматина и образованием пузырьков плазматической мембраны или апоптотических телец [1]. Апоптотическая гибель клеток помогает устранить клетки, которые являются старыми или больше не нужны, не вызывая повреждения окружающих тканей и иницируя иммунный ответ. В случае, когда происходит нарушение утилизации иммунных клеток, нарушается именно иммунный гомеостаз, приводящий к различным иммунным и аутоиммунным патологиям. В случаях повышенной гибели клеток из-за инфекции, или при встрече с каким либо аллергеном (апоптоз эпителиальных клеток при легочных заболеваниях), клиренс апоптотических клеток опосредуется как резидентными фагоцитами, так и фагоцитами, привлеченными из кровотока [19]. Нарушение клиренса апоптотических клеток на ранних стадиях гибели и прогрессирование до вторичного некротического состояния может вызвать воспаление ткани из-за высвобождения клеточного содержимого или воздействия иным образом секвестрированных внутриклеточных фрагментов. Помимо резидентных фагоцитов, циркулирующие моноциты также могут рекрутироваться

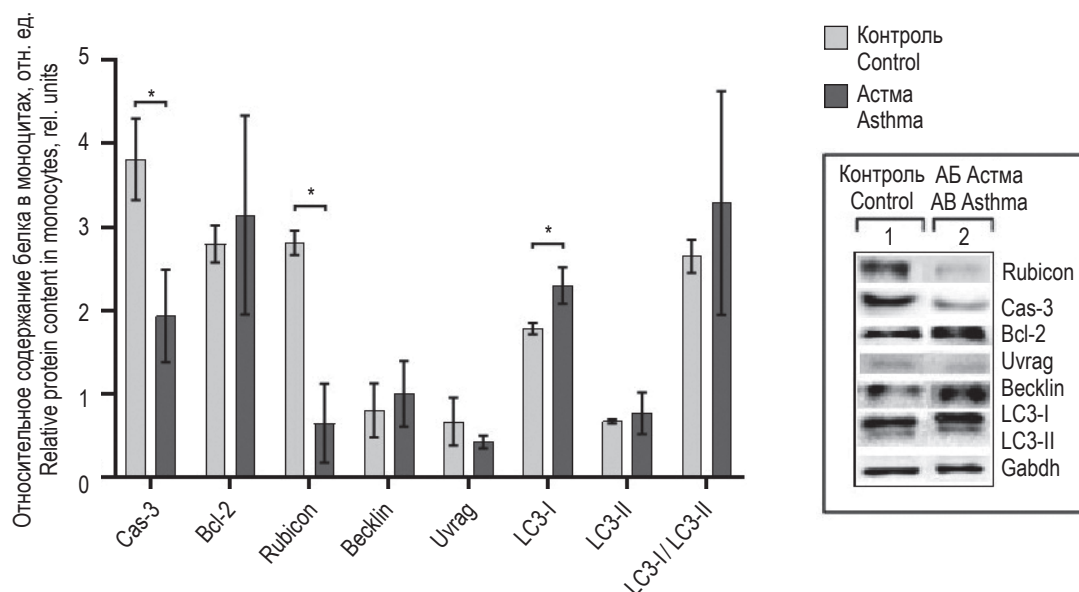


Рисунок 5. Анализ апоптотических (Cas-3 и Bcl-2), аутофагических (Beclin-1, LC3) и белков LAP-ассоциированного фагоцитоза (Rubicon, LC3) в моноцитах здоровых доноров (1) и больных тяжелой формой астмы (2)

Примечание. * – $p \leq 0,05$.

Figure 5. Analysis of apoptotic (Cas-3 and Bcl-2), autophagic (Beclin-1, LC3) and LAP-associated phagocytosis proteins (Rubicon, LC3) in monocytes of healthy donors (1) and patients with severe asthma (2)

Note. *, $p \leq 0.05$.

во время острой необходимости. Рекрутированные фагоциты могут действовать совместно или конкурировать с резидентными фагоцитами и тем самым влиять на иммунный ответ.

Способность макрофагов утилизировать апоптотический груз при atopической бронхиальной астме была продемонстрирована Chung-Hsiang [22]. Было выявлено, что у макрофагов больных АБА имеются дефекты, включающие снижение фагоцитоза, снижение эффероцитоза и усиление апоптоза самих макрофагов, что в конечном итоге приводило к уязвимости дыхательных путей [22].

У нас вызывает большой интерес ответ на вопрос, как эти механизмы протекают в циркулирующих моноцитах. Появляются ли эти дефекты в ходе поляризации в провоспалительные и противовоспалительные макрофаги, или моноциты уже имеют схожие повреждения [14]. Также стоит вопрос о протекании канонической аутофагии в этих клетках и его влиянии на гомеостаз иммунных клеток.

В работе представлен анализ содержания некоторых ключевых белков LAP-пути в моноцитах периферической крови больных бронхиальной астмой тяжелого течения. Ранее было установлено, что для этой группы больных характерна устойчивость клеток к апоптозу. В связи с этим в клетках активируется аутофагия, альтернативный путь клеточной гибели. Установленная нами пониженная экспрессия белка Rubicon в группе

больных АБА на фоне здоровых доноров указывает на то, что в моноцитах больных LAP-путь не активируется.

Процесс слияния лизосом с аутофагосомами позитивно регулируется комплексом UVRAG-Vps34-Beclin-1, а также негативно регулируется комплексом Rubicon-UVRAG-Vps34-Beclin-1, т.е. белок Rubicon является ключевым регулятором между канонической и неканонической аутофагии [40]. В случае если преобладает комплекс белков Rubicon-UVRAG-Vps34-Beclin-1 в фагоцитирующих клетках запускается LC3-ассоциированный фагоцитоз, и в этом случае клетка перерабатывает не собственные органеллы, как в случае канонической аутофагии, а внешнечелочные патогены, в том числе и апоптотические тельца других клеток [28, 29].

Нами показано, что в моноцитах больных астмой содержание белка Rubicon, отвечающего за протекание LAP и формирование одномембранной структуры, необходимой для деградации апоптотических клеток, было ниже чем в моноцитах здоровых доноров (рис. 5).

Анализы трансмиссионной электронной микроскопии (рис. 4), показывающее низкое содержание одномембранных структур (лапосом) на фоне высокого содержания двухмембранных структур относящихся к аутофагии, также доказывают низкое протекание LAP при тяжелой форме atopической бронхиальной астме.

Заключение

Таким образом, повышенная экспрессия белка Rubicon — маркера LC3-ассоциированного фагоцитоза (установленная в моноцитах здоровых доноров) свидетельствует об активации LAP-пути, по которому происходит фагоцитоз дефектных Т-клеток в норме. Подавление экспрессии белка

Rubicon в моноцитах пациентов с астмой тяжелой формы свидетельствует о нарушении этого физиологического процесса.

Полученные результаты дают возможность дальнейшего изучения молекулярных механизмов нарушения LAP-пути в моноцитах при развитии тяжелой формы астмы.

Список литературы / References

1. Деев Р.В., Билялов А.И., Жампеисов Т.М. Современные представления о клеточной гибели // Гены и Клетки, 2018. Т. 13, № 1. С. 6-19. [Deev R.V., Bilyalov A.I., Zhampeisov T.M. Modern ideas about cell death. *Geny i Kletki = Genes and Cells*, 2018, Vol. 13, no. 1, pp. 6-19. (In Russ.)]
2. Ибрагимов Б.Р., Скибо Ю.В., Абрамова З.И. Аутофагия и LC3-ассоциированный фагоцитоз: сходства и различия // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 2. С. 233-252. [Ibragimov B.R., Skibo Yu.V., Abramova Z.I. Autophagy and LC3-associated phagocytosis: similarities and differences. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2023, Vol. 25, no. 2, pp. 233-252. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-AAL-2569.
3. Скибо Ю.В., Тихомирова М.В., Абрамов С.Н., Биктагирова Э.М., Решетникова И.Д., Акберова Н.И., Абрамова З.И. Анализ экспрессии ключевых белков-регуляторов апоптоза и аутофагии в Т-лимфоцитах больных бронхиальной астмой // Ученые записки Казанского университета. Серия естественные науки, 2019. Т. 161, № 4. С. 505-520. [Skibo Yu.V., Tikhomirova M.V., Abramov S.N., Biktagirova E.M., Reshetnikova I.D., Akberova N.I., Abramova Z.I. Analysis of the expression of key protein regulators of apoptosis and autophagy in T-lymphocytes of patients with bronchial asthma. *Uchenye zapiski Kazanskogo universiteta. Seriya estestvennye nauki = Scientific Notes of Kazan University. Natural Science Series*, 2019, Vol. 161, no. 4, pp. 505-520. (In Russ.)]
4. Скибо Ю.В., Фатхуллина А.Р., Ибрагимов Б.Р., Абрамов С.Н., Исмагилова Р.Р., Биктагирова Э.М., Андрианова И.А., Максудова А.Н., Абрамова З.И. Индукция апоптоза и аутофагии в Т-лимфоцитах пациентов с системной красной волчанкой // Казанский медицинский журнал, 2020. Т. 101, № 3. С. 347-355. [Skibo Yu.V., Fathullina A.R., Ibragimov B.R., Abramov S.N., Ismagilova R.R., Biktagirova E.M., Andrianova I.A., Maksudova A.N., Abramova Z.I. Induction of apoptosis and autophagy in T-lymphocytes of patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal*, 2020, Vol. 101, no. 3, pp. 347-355. (In Russ.)]
5. Смольникова М.В., Смирнова С.В., Ильенкова Н.А., Коноплева О.С. Иммунологические маркеры неконтролируемого течения атопической бронхиальной астмы у детей // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 4. С. 453-460. [Smolnikova M.V., Smirnova S.V., Ilyenkova N.A., Konopleva O.S. Immunological markers of uncontrolled atopic bronchial asthma in children. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 4, pp. 453-460. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-453-460.
6. Ярилин А.А., Никонова М.Ф., Ярилина А.А., Варфоломеева М.И., Григорьева Т.Ю. Апоптоз, роль в патологии и значимость его оценки при клинико-иммунологическом обследовании больных // Медицинская иммунология, 2000. Т. 2, № 1. С. 7-16. Yarilin A.A., Nikonova M.F., Yarilina A.A., Varfolomeeva M.I., Grigorieva T.Yu. Apoptosis, importance of its evaluation in immunopathological states. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2000, Vol. 2, no. 1, pp. 7-16. (In Russ.)]
7. Aguirre L.A., Montalbán-Hernández K., Avendaño-Ortiz J., Marín E., Lozano R., Toledano V., Sánchez-Maroto L., Terrón V., Valentín J., Pulido E., Casalvilla J.C., Rubio C., Diekhorst L., Laso-García F., Del Fresno C., Collazo-Lorduy A., Jiménez-Munarriz B., Gómez-Campelo P., Llanos-González E., Fernández-Velasco M., Rodríguez-Antolín C., Pérez de Diego R., Cantero-Cid R., Hernández-Jimenez E., Álvarez E., Rosas R., Dies López-Ayllón B., de Castro J., Wculek S.K., Cubillos-Zapata C., Ibáñez de Cáceres I., Díaz-Agiero P., Gutiérrez Fernández M., Paz de Miguel M., Sancho D., Schulte L., Perona R., Belda-Iniesta C., Boscá L., López-Collazo E. Tumor stem cells fuse with monocytes to form highly invasive tumor-hybrid cells. *Oncoimmunology*, 2020, Vol. 9, no. 1, 1773204. doi: 10.1080/2162402X.2020.1773204.
8. Arteaga-Blanco L.A., Mojoli A., Monteiro R.Q., Sandim V., Menna-Barreto R.F.S., Pereira-Dutra F.S., Bozza P.T., Resende R.O., Bou-Habib D.C. Characterization and internalization of small extracellular vesicles released by human primary macrophages derived from circulating monocytes. *PloS One*, 2020, Vol. 15, no. 8, e0237795. doi: 10.1371/journal.pone.0237795.
9. Boada-Romero E., Martinez J., Heckmann B.L., Green D.R. The clearance of dead cells by efferocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2020, Vol. 21, no. 7, pp. 398-414.
10. Costa G.M.J., Lacerda S.M.S.N., Figueiredo A.F.A., Wnuk N.T., Brener M.R.G., Andrade L.M., Campolina-Silva G.H., Kauffmann-Zeh A., Pacifico L.G.G., Versiani A. F., Antunes M.M., Souza F.R., Cassali G.D., Caldeira-Brant A.L., Chiarini-Garcia H., de Souza F.G., Costa V.V., da Fonseca F.G., Nogueira M.L., Campos G.R.F., Kangussu L.M., Martins E.M.N., Antonio L.M., Bittar C., Rahal P., Aguiar R.S., Mendes B.P., Procópio M.S., Furtado T.P., Guimaraes Y.L., Menezes G.B., Martinez-Marchal A., Orwig K.E., Briño-Enríquez M., Furtado M.H. High SARS-CoV-2 tropism and activation of immune cells in the testes of non-vaccinated deceased COVID-19 patients. *BMC Biol.*, 2023, Vol. 21, no. 1, 36. doi: 10.1186/s12915-022-01497-8.

11. Cunha L.D., Yang M., Carter R., Guy C., Harris L., Crawford J.C., Quarato G., Boada-Romero E., Kalkavan H., Johnson M.D.L., Natarajan S., Turnis M.E., Finkelstein D., Opferman J.T., Gawad C., Green D.R. LC3-Associated Phagocytosis in Myeloid Cells Promotes Tumor Immune Tolerance. *Cell*, 2018, Vol. 175, no. 2, pp. 429-441.
12. Florey O., Kim S.E., Sandoval C.P., Haynes C.M., Overholtzer M. Autophagy machinery mediates macroendocytic processing and entotic cell death by targeting single membranes. *Nat. Cell Biol.*, 2011, Vol. 13, no. 11, pp. 1335-1343.
13. Gomzikova M.O., Zhuravleva M.N., Miftakhova R.R., Arkhipova S.S., Evtugin V.G., Khaiboullina S.F., Kiyasov A.P., Persson J.L., Mongan N.P., Pestell R.G., Rizvanov A.A. Cytochalasin B-induced membrane vesicles convey angiogenic activity of parental cells. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, no. 41, pp. 70496-70507.
14. Heckmann B.L., Boada-Romero E., Cunha L.D., Magne J., Green D.R. LC3-Associated Phagocytosis and Inflammation. *J. Mol. Biol.*, 2017, Vol. 429, no. 23, pp. 3561-3576.
15. Heckmann B.L., Teubner B.J.W., Tummers B., Boada-Romero E., Harris L., Yang M., Guy C.S., Zakharenko S.S., Green D.R. LC3-Associated Endocytosis Facilitates β -Amyloid Clearance and Mitigates Neurodegeneration in Murine Alzheimer's Disease. *Cell*, 2019, Vol. 178, no. 3, pp. 536-551.
16. Herb M., Gluscho A., Schramm M. LC3-associated phagocytosis – The highway to hell for phagocytosed microbes. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2020, Vol. 101, pp. 68-76.
17. Inomata M., Xu S., Chandra P., Meydani S.N., Takemura G., Philips J.A., Leong J.M. Macrophage LC3-associated phagocytosis is an immune defense against *Streptococcus pneumoniae* that diminishes with host aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2020, Vol. 117, no. 52, pp. 33561-33569.
18. Ishii K.J., Kawagoe T., Koyama S., Matsui K., Kumar H., Kawai T., Uematsu S., Takeuchi O., Takeshita F., Coban C., Akira S. TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines. *Nature*, 2008, Vol. 451, no. 7179, pp. 725-729.
19. Ji W.J., Ma Y.Q., Zhou X., Zhang Y.D., Lu R.Y., Sun H.Y., Z.Z. G., Zhang Z., Li Y.M., Wei L.Q. Temporal and spatial characterization of mononuclear phagocytes in circulating, lung alveolar and interstitial compartments in a mouse model of bleomycin-induced pulmonary injury. *J. Immunol. Met.*, 2014, Vol. 403, no. 1-2, pp. 7-16.
20. Kelley S.M., Ravichandran K.S. Putting the brakes on phagocytosis: "don't-eat-me" signaling in physiology and disease. *EMBO Rep.*, 2021, Vol. 22, no. 6, e52564. doi: 10.15252/embr.202152564.
21. Lambrecht B.N., Hammad H. The immunology of the allergy epidemic and the hygiene hypothesis. *Nat. Immunol.*, 2017, Vol. 18, no. 10, pp. 1076-1083.
22. Li C.H., Tsai M.L., Chiou H.C., Lin Y.C., Liao W.T., Hung C.H. Role of Macrophages in Air Pollution Exposure Related Asthma. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 23, no. 20, 12337. doi: 10.3390/ijms232012337.
23. Li T., Kong L., Li X., Wu S., Attri K. S., Li Y., Gong W., Zhao B., Li L., Herring L.E., Asara J. M., Xu L., Luo X., Lei Y.L., Ma Q., Seveau S., Gunn J.S., Cheng X., Singh P.K., Green D.R., Wang H., Wen H. *Listeria monocytogenes* upregulates mitochondrial calcium signalling to inhibit LC3-associated phagocytosis as a survival strategy. *Nat. Microbiol.*, 2021, Vol. 6, no. 3, pp. 366-379.
24. Li Y., Yong Y.L., Yang M., Wang W., Qu X., Dang X., Shang D., Shao Y., Liu J., Chang Y. Fine particulate matter inhibits phagocytosis of macrophages by disturbing autophagy. *FASEB J.*, 2020, Vol. 34, no. 12, pp. 16716-16735.
25. Lim J., Park H., Heisler J., Maculins T., Roose-Girma M., Xu M., McKenzie B., van Lookeren Campagne M., Newton K., Murthy A. Autophagy regulates inflammatory programmed cell death via turnover of RHIM-domain proteins. *eLife*, 2019, Vol. 8, e44452. doi: 10.7554/eLife.44452.
26. Magné J., Green D.R. LC3-associated endocytosis and the functions of Rubicon and ATG16L1. *Sci. Adv.*, 2022, Vol. 8, no. 43, eabo5600. doi: 10.1126/sciadv.abo5600.
27. Martinez J., Cunha L.D., Park S., Yang M., Lu Q., Orchard R., Li Q.Z., Yan M., Janke L., Guy C., Linkermann A., Virgin H.W., Green D.R. Corrigendum: Noncanonical autophagy inhibits the autoinflammatory, lupus-like response to dying cells. *Nature*, 2016, Vol. 539, no. 7627, 124. doi: 10.1038/nature19837.
28. Masud S., Prajsnar T.K., Torraca V., Lamers G.E.M., Benning M., Vaart M.V.D., Meijer A.H. Macrophages target *Salmonella* by Lc3-associated phagocytosis in a systemic infection model. *Autophagy*, 2019, Vol. 15, no. 5, pp. 796-812.
29. Masud S., van der Burg L., Storm L., Prajsnar T.K., Meijer A.H. Rubicon-Dependent Lc3 Recruitment to *Salmonella*-Containing Phagosomes Is a Host Defense Mechanism Triggered Independently From Major Bacterial Virulence Factors. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2019, Vol. 9, 279. doi: 10.3389/fcimb.2019.00279.
30. Matsunaga K., Saitoh T., Tabata K., Omori H., Satoh T., Kurotori N., Maejima I., Shirahama-Noda K., Ichimura T., Isobe T., Akira S., Noda T., Yoshimori T. Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat. Cell Biol.*, 2009, Vol. 11, no. 4, pp. 385-396.
31. Mehta P., Henault J., Kolbeck R., Sanjuan M.A. Noncanonical autophagy: one small step for LC3, one giant leap for immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 2014, Vol. 26, pp. 69-75.
32. Minnullina L., Kostennikova Z., Evtugin V., Akosah Y., Sharipova M., Mardanov A. Diversity in the swimming motility and flagellar regulon structure of uropathogenic *Morganella morganii* strains. *Int. Microbiol.*, 2022, Vol. 25, no. 1, pp. 111-122.
33. Morioka S., Maueröder C., Ravichandran K.S. Living on the Edge: Efferocytosis at the Interface of Homeostasis and Pathology. *Immunity*, 2019, Vol. 50, no. 5, pp. 1149-1162.
34. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 1963, Vol. 17, no. 1, pp. 208-212.

35. Sanjuan M.A., Dillon C.P., Tait S.W., Moshiah S., Dorsey F., Connell S., Komatsu M., Tanaka K., Cleveland J.L., Withoff S., Green D.R. Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature*, 2007, Vol. 450, no. 7173, pp. 1253-1257.
36. Sun Q., Westphal W., Wong K.N., Tan I., Zhong Q. Rubicon controls endosome maturation as a Rab7 effector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, Vol. 107, no. 45, pp. 19338-19343.
37. Tabata K., Matsunaga K., Sakane A., Sasaki T., Noda T., Yoshimori T. Rubicon and PLEKHM1 negatively regulate the endocytic/autophagic pathway via a novel Rab7-binding domain. *Mol. Biol. Cell*, 2010, Vol. 21, no. 23, pp. 4162-4172.
38. Yang C.S., Lee J.S., Rodgers M., Min C.K., Lee J.Y., Kim H.J., Lee K.H., Kim C.J., Oh B., Zandi E., Yue Z., Kramnik I., Liang C., Jung J.U. Autophagy protein Rubicon mediates phagocytic NADPH oxidase activation in response to microbial infection or TLR stimulation. *Cell Host Microbe*, 2012, Vol. 11, no. 3, pp. 264-276.
39. Zhang P., Zhu J., Zhang L., Lv X., Guo D., Liao L., Huang S., Peng Z. The Effects of Ginkgo biloba Extract on Autophagy in Human Macrophages Stimulated by Cigarette Smoke Extract. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)*, 2023, Vol. 28, no. 3, 50. doi: 10.31083/j.fbl2803050.
40. Zhong Y., Wang Q.J., Li X., Yan Y., Backer J.M., Chait B.T., Heintz N., Yue Z. Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nat. Cell Biol.*, 2009, Vol. 11, no. 4, pp. 468-476.

Авторы:

Ибрагимов Б.Р. — младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории «Иммунопатология», Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Скибо Ю.В. — к.б.н., старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории «Иммунопатология», Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Решетникова И.Д. — к.м.н., врио директора, заместитель директора по научной работе ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора; доцент, Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Абрамов С.Н. — младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории «Иммунопатология», Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Даминова А.Г. — к.б.н., старший научный сотрудник междисциплинарного центра «Аналитическая микроскопия» ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Евтюгин В.Г. — к.б.н., директор междисциплинарного центра «Аналитическая микроскопия» ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Абрамова З.И. — д.б.н., профессор кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии, главный научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории «Иммунопатология», Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Authors:

Ibragimov B.R., Junior Research Associate, Laboratory of Immunopathology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Skibo Yu.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Immunopathology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Reshetnikova I.D., PhD (Medicine) Acting Director, Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation; Associate Professor, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Abramov S.N., Junior Research Associate, Laboratory of Immunopathology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Daminova A.G., PhD (Biology), Senior Research Associate, Interdisciplinary Center for Analytical Microscopy, Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Evtugin V.G., PhD (Biology), Director, Interdisciplinary Center for Analytical Microscopy, Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Abramova Z.I., PhD, MD (Biology), Professor, Department of Biochemistry, Biotechnology and Pharmacology, Chief Research Associate, Laboratory of Immunopathology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Поступила 13.05.2023
Отправлена на доработку 26.06.2023
Принята к печати 04.10.2023

Received 13.05.2023
Revision received 26.06.2023
Accepted 04.10.2023