

АССОЦИАЦИЯ NADPH-ОКСИДАЗЫ 2 (NOX2) С РАЗВИТИЕМ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ

Б.Р. Ибрагимов^{1*}, А.С. Демерцидис¹, И.Д. Решетникова^{1,2}, Ю.В. Скибо¹, С.Н. Абрамов¹, З.И. Абрамова¹¹Казанский (Приволжский) федеральный университет,
420008, Казань, ул. Кремлевская 18; *e-mail: Ibragimov94@inbox.ru²Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии, Казань

Фагоцитирующие клетки уничтожают бактерии, аллергены и апоптотические клетки посредством антимикробных реакций, сопряженных с фагоцитозом и включающих генерацию активных форм кислорода (АФК) и доставку гидролитических ферментов из лизосом в фагосому. АФК, продуцируемые NADPH-оксидазой 2 (NOX2), которые задействованы в механизме LC3-ассоциированного фагоцитоза, участвуют в развитии врожденных и адаптивных иммунных реакций, что приводит, в том числе, к ремоделированию дыхательных путей и гиперреактивности. Целью настоящей работы было установление ассоциации NOX2 с отягощенностью протекания atopической бронхиальной астмы (АБА). Уровень АФК определяли в моноцитах здоровых доноров и пациентов с atopической бронхиальной астмой с помощью дигидроамина-123 (dhr-123). Анализ уровня экспрессии гена NOX2 в моноцитах здоровых доноров и пациентов с atopической бронхиальной астмой проводили методом ОТ-ПЦР. В присутствии РМА (форбол-12-миристат-13-ацетат) происходило значительное увеличение флуоресценции родамина-123 (Rho-123) во всех исследуемых группах. При этом было обнаружено достоверное увеличение медианы флуоресценции Rho-123 в группе с тяжелой АБА по отношению к группе здоровых доноров и пациентов с легкой степенью АБА, а также к группе пациентов со средней степенью АБА. Достоверное увеличение экспрессии гена NOX2 было обнаружено в группах средней и тяжелой степени АБА по сравнению с остальными исследованными группами. Исходя из полученных данных можно предположить, что с увеличением активности NOX2 – ключевого фермента LC3-ассоциированного фагоцитоза – происходит отягощение протекания АБА.

Ключевые слова: NOX2; NADPH-оксидаза 2; LC3-ассоциированный фагоцитоз; моноциты, atopическая бронхиальная астма

DOI: 10.18097/BMCRM00272

ВВЕДЕНИЕ

NADPH-оксидаза 2 (NOX2) представляет собой ключевой компонент иммунной системы, обеспечивающий защиту организма путем выработки активных форм кислорода (АФК): супероксид аниона ($O_2^{\cdot-}$), гидроксильного радикала ($\cdot OH$), пероксида водорода (H_2O_2) [1]. NOX2 экспрессируется преимущественно в нейтрофилах, моноцитах и макрофагах. Она участвует в процессах хемотаксиса (привлечения лейкоцитов к месту повреждения или инфекции), LC3-ассоциированного фагоцитоза (поглощения и уничтожения инфекционных агентов) и индуцировании респираторного взрыва (резкого увеличения уровня АФК в ответ на бактериальную или грибковую инфекцию). Именно эта способность NOX2 производить АФК лежит в основе процесса LC3-ассоциированного фагоцитоза (LAP) [2, 3]. На начальной стадии созревания фагосомы в ответ на соответствующие сигнальные события, такие как передача сигналов от рецепторов FcγR и TLR, собирается активный комплекс NADPH-оксидазы, который обеспечивает выработку реакционноспособных видов кислорода (АФК) непосредственно внутри везикулы. Внутри фагосомы АФК продуцируются комплексом NADPH-оксидазы. Rubicon стабилизирует комплекс посредством

взаимодействия с p22phox, в то время как p40phox взаимодействует с фосфатидилинозитол-3-фосфат (PI(3)P) для привлечения остальных компонентов. Одновременно цитозольный LC3 подвергается модификации с помощью специального конъюгационного аппарата, приводящего к формированию LC3-II на поверхности фагосомальной мембраны [3]. Вскоре после того, как LC3 соединяется с мембраной фагосомы, образовавшаяся структура быстро сливается с лизосомами, обеспечивая быструю очистку от захваченного материала. Отсутствие эффективного LC3-ассоциированного фагоцитоза (LAP) приводит к нарушению контроля над проникшими патогенами и запускает значительное увеличение продукции провоспалительных цитокинов, таких как IL-6 и IL-1β [4, 5].

Несмотря на важные защитные функции, повышенная экспрессия NOX2 негативно сказывается на организме, вызывая ряд неблагоприятных эффектов [6]. Путём активации сигнальных путей (MAPK, NF-κB, PI3K/Akt) NOX2 стимулирует выделение провоспалительных цитокинов (IL-6, TNF-α, IL-1β), усиливая воспаление и способствуя хронизации патологического процесса. Эти цитокины усиливают воспаление, привлекая дополнительные иммунные клетки к очагу поражения и обеспечивая дальнейшее распространение воспалительного



процесса [7]. Помимо стимуляции выделения провоспалительных цитокинов, повышенная продукция АФК, вызванная активностью NOX2, нарушает механизм LC3-ассоциированного фагоцитоза (LAP). Избыточная продукция АФК подавляет синтез фосфатидилинозитол-3-фосфата (PI(3)P), нарушая нормальный ход образования мембранной оболочки. PI(3)P необходим для привлечения ATG16L1/ATG5 комплекса, который формирует мембрану вокруг частиц-мишеней, инициируя дальнейшее протекание процесса LAP. Таким образом, NOX2 влияет на активность LC3 именно через изменение концентрации PI(3)P [8].

Астма является распространенным хроническим воспалительным заболеванием дыхательных путей. Наличие астмы имеет тенденцию к увеличению выработки активных форм кислорода (АФК), а антиоксидантная система в легких недостаточна для его смягчения. Повышенный уровень АФК может вызывать вредные патофизиологические нарушения астмы [1, 9, 10].

Большинство имеющихся публикаций сосредоточено на общих аспектах окислительного стресса и значении отдельных метаболитов АФК в воспалительном процессе дыхательных путей [11-14].

Целью настоящей работы было установление ассоциации NOX2 с отягощенностью протекания атопической бронхиальной астмы (АБА).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Характеристика исследуемых групп

Объектом исследования были моноциты, выделенные из фракции лейкоцитов. Образцы фракции лейкоцитов здоровых доноров и пациентов с атопической бронхиальной астмой были предоставлены Казанским научно-исследовательским институтом эпидемиологии и микробиологии.

Все пациенты находились под наблюдением врачей и не получали медикаментозного лечения во время проведения исследований. Здоровые доноры и пациенты с поставленным диагнозом проживают на территории Республики Татарстан. Каждая степень тяжести характеризовалась своими особенностями течения заболевания и симптоматики. Диагноз атопической бронхиальной астмы устанавливался врачом-пульмонологом на основании клинической картины, истории болезни и соответствующих лабораторных тестов. Постановка диагноза и оценка её степени тяжести осуществлялась на основе критериев, указанных в клинических рекомендациях Global Initiative for Asthma (GINA) [15].

Группа контроля (здоровые участники) включала 15 человек в возрасте от 25 до 32 лет включительно.

Для пациентов с лёгкой персистирующей формой аллергической бронхиальной астмы (АБА) характерны редкие эпизоды одышки, возникающие приблизительно один раз в месяц и только в дневное время. Приступы имели лёгкий характер и легко устранялись самостоятельно либо после единичного приёма бронхолитического препарата (ингаляционного или перорального). Группа пациентов с лёгкой АБА включала 15 человек в возрасте от 29 до 35 лет включительно.

Для пациентов со средней персистирующей формой АБА характерны учащенные приступы одышки,

возникающие чаще одного раза в неделю, но реже одного раза в сутки. Эпизоды сопровождались изменениями дыхательной функции и требовали однократного приёма бронхолитика и/или внутривенного введения глюкокортикоидов. Группа пациентов со среднетяжёлым течением АБА включала 15 человек в возрасте от 33 до 40 лет включительно.

Для пациентов с тяжелой формой АБА характерны ежедневные симптомы и частые обострения, включая ночные приступы одышки. Приступы протекают тяжело и требуют комплексного подхода к лечению, включающего парентеральное введение бронхолитиков в сочетании с глюкокортикоидными препаратами. Группу пациентов с тяжелой АБА составляли 16 человек в возрасте от 25 до 68 лет. Заболевание значительно ограничивает физическую активность и нарушает сон пациента.

Выделение моноцитов

Выделение моноцитов проводили в два этапа: на первом этапе выделяли общую фракцию лейкоцитов методом центрифугирования в градиенте плотности фиколла ($\rho = 1.077$ г/мл), («ПанЭко», Россия); на втором этапе проводили обогащение фракции моноцитов методом адгезии [16]. На сегодняшний день для обогащения фракции моноцитов используют несколько основных подходов, отличающихся друг от друга по степени обогащения и жизнеспособности клеток. Среди них: метод обогащения путем адгезии к пластику, метод центрифугирования на градиенте перколлы и метод магнитной сепарации с позитивной или негативной селекцией клеток. Однако обогащение методом адгезии является более доступным из указанных вариантов [17].

Обогащение методом адгезии проводили путем культивирования в среде RPMI в течение 2 ч при 37°C и 5% CO₂. Не прикрепившиеся клетки отделяли путем удаления надосадочной жидкости, а прикрепившиеся клетки (моноциты) трижды промывали фосфатно-солевым буфером (таблетки фосфатно-солевого буфера, pH 7.4, «ПанЭко») [16].

Степень чистоты моноцитов определяли путем окрашивания суспензии клеток моноклональными антителами к мембранному рецептору CD14, конъюгированными с флуоресцеин изотиоцианатом (FITC Anti-human CD14, «BioLegend», США).

Определение уровня АФК

АФК определяли в моноцитах здоровых доноров и пациентов с атопической бронхиальной астмой методом проточной цитометрии с использованием DHR-123, адаптированным из ранее опубликованных работ [18-34]. Метод DHR-123 был оптимизирован для обеспечения максимально возможного сигнала флуоресценции, обнаруживаемого в образцах с наибольшей величиной разницы между положительными и отрицательными контролями.

Исходный раствор DHR-123 (Dihydrorhodamine-123, «Sigma-Aldrich», США, 5.0 мг DHR-123 в 1.0 мл диметилсульфоксида (DMSO), «Евроген», Россия) хранили в аликвотах по 50 мкл при температуре -70°C. Перед проведением анализа 1 мкл исходного раствора разводили в 99 мкл фосфатно-солевого буфера. Для окрашивания

Таблица 1. Праймеры, используемые при ОТ–ПЦР для определения уровня экспрессии гена NOX2 в моноцитах здоровых доноров и пациентов с atopической бронхиальной астмой.

Праймеры	Последовательность праймеров (5' → 3')	Размер праймера (пар оснований)
NOX2 прямой праймер	AAGCCTTGGCTGAAACCCTG	20
NOX2 обратный праймер	TTGAAAATGAAATGCACTCCCCG	23
B2M прямой праймер	CCACTGAAAAAGATGAGTATGCCT	24
B2M обратный праймер	CCAATCCAAATGCGGCATCTTCA	23

одного образца использовали 20 мкл полученного раствора DHR–123 (50 мкг/мл), что составляет 1 мкг красителя на 100 мкл суспензии клеток (5×10^5 клеток), или конечный раствор с концентрации 10 мкг/мл [10].

Форбол–12–миристал–13–ацетат (PMA, Phorbol 12–myristate–13–acetate, «Sigma–Aldrich», США) растворяли в DMSO. Далее 1 мкл из полученного раствора (1 мг/мл) разводили в 199 мкл фосфатно–солевого буфера (раствор с концентрацией 5 мкг/мл). Для положительного контроля одного образца использовали 20 мкл раствора PMA, что составляет 0.1 мкг активатора на стимуляцию 100 мкл суспензии клеток (5×10^5 клеток).

Перед началом анализа клетки инкубировали 10 мин на льду. При анализе на каждый образец использовали две пробы: в качестве отрицательного контроля использовали образец, инкубированный только с DHR–123; в качестве положительного контроля использовали образец, инкубированный с PMA и DHR–123. В первую пробирку FACS или эппендорф (отрицательный контроль) добавляли 20 мкл фосфатно–солевого буфера. Во вторую пробирку (положительный контроль) добавляли 20 мкл PMA (5 мкг/мл – 0.1 мкг на образец). Образцы вортиксовали и инкубировали на водяной бане в течение 10 мин при 37°C. Затем добавляли 20 мкл DHR–123 (50 мкг/мл – 1 мкг на образец) и клетки инкубировали в течение ещё 10 мин. Общее время инкубации составило 20 мин при 37°C на водяной бане в темноте. Затем образцы центрифугировали при 11000 g, а супернатант удаляли. Далее к образцам добавляли фосфатно–солевой буфер (PBS) и промывали клетки центрифугированием.

Окислительное превращение диgidрорадамина–123 (DHR–123) во флуоресцентный родамин–123 (Rho–123) определяли на проточном цитометре FACSCalibur («Becton Dickinson», США). Флуоресценция Rho–123, возникающая при окислении DHR–123, детектируется на канале FL1 (525 нм).

Анализ медианы и геометрического среднего (gMean) интенсивности флуоресценции родамин–123 (Rho–123) проводили в программе FLOWJO согласно указанным протоколам [18, 27, 31].

Определение уровня экспрессии гена NOX2

Анализ уровня экспрессии гена NOX2 в моноцитах здоровых доноров и пациентов с atopической бронхиальной астмой проводили методом ОТ–ПЦР. Выделение РНК проводили фенол–хлороформным методом с использованием коммерческого реагента для выделения суммарной РНК из биологических образцов ExtractRNA («Евроген») согласно инструкции производителя. К клеткам добавляли 1 мл ExtractRNA, с последующим пипетированием и тщательным

перемешиванием с помощью вортекса. Далее клетки лизировали при комнатной температуре в течение 10 мин, для полной диссоциации нуклеопротеидных комплексов. Затем центрифугировали лизат в течение 10 мин при 11000 g при комнатной температуре. Не касаясь осадка, аккуратно переносили супернатант в новую пробирку. К супернатанту добавляли 0.2 мл хлороформа, с последующим центрифугированием в течение 10 минут при 11000 g при комнатной температуре. В ходе центрифугирования происходило разделение смеси на три фазы: нижнюю – органическую фенол–хлороформную фазу желтоватого оттенка, интерфазу белого цвета и верхнюю бесцветную водную фазу содержащую РНК. Водную фазу отбирали под наклоном пробирки 45°, не касаясь интерфазы. К водной фазе добавляли 0.5 мл хлороформа с повторным центрифугированием в течение 10 мин при 11000 g при комнатной температуре. Далее верхнюю водную фазу переносили в чистую пробирку; добавляя 0.5 мл 100% изопропанола, с аналогичным центрифугированием при тех же условиях. Супернатант отбирали, оставляя осадок РНК на дне пробирки, к которому затем добавляли 1 мл 80% этанола. Пробирку центрифугировали в течение 5 мин при 11000 g при комнатной температуре, с последующим удалением супернатанта. Осадок высушивали при комнатной температуре в течение 5–7 мин или в термостате при 60–65°C в течение 1–2 мин. К осадку РНК добавляли воду, свободную от нуклеаз, в необходимом объеме. Для улучшения растворения образец прогревали при 55–60°C в течение 3–5 мин.

Синтез кДНК из полученной матрицы РНК проводили с использованием коммерческого комплекта реагентов Реверта–L согласно инструкции производителя («АмплиСенс», Россия). Для этого готовили реакцию смесь на 12 реакций. В пробирку RT–mix вносили 5 мкл RT–mix–1, к полученному раствору добавляли 6 мкл ревертазы (MMIv). Вносили в микропробирки по 10 мкл полученной реакционной смеси. Затем к реакционной смеси добавляли по 10 мкл РНК–пробы.

Далее проводили обратную транскрипцию в термостате (Драй–блок Biosan TDB–120, «Biosan», Латвия) при температуре 37°C в течение 30 мин. Полученную в реакции обратной транскрипции кДНК разводили ДНК–буфером в два раза для последующей постановки ПЦР (к 20 мкл кДНК добавляли 20 мкл ДНК–буфера).

Для проведения ПЦР использовали следующие компоненты реакционной смеси: 10X Taq Turbo буфер в объеме 2.5 мкл («Евроген»), dNTPs 50x (10mM) в объеме 0.5 мкл («Евроген»), Taq ДНК–полимераза в объеме 0.5 мкл («Евроген»), интеркалирующий краситель SYBR Green I 50x в объеме 0.5 мкл («Евроген»), DMSO в объеме 1 мкл («Евроген»), комплементарная ДНК матрица (1–100 нг на

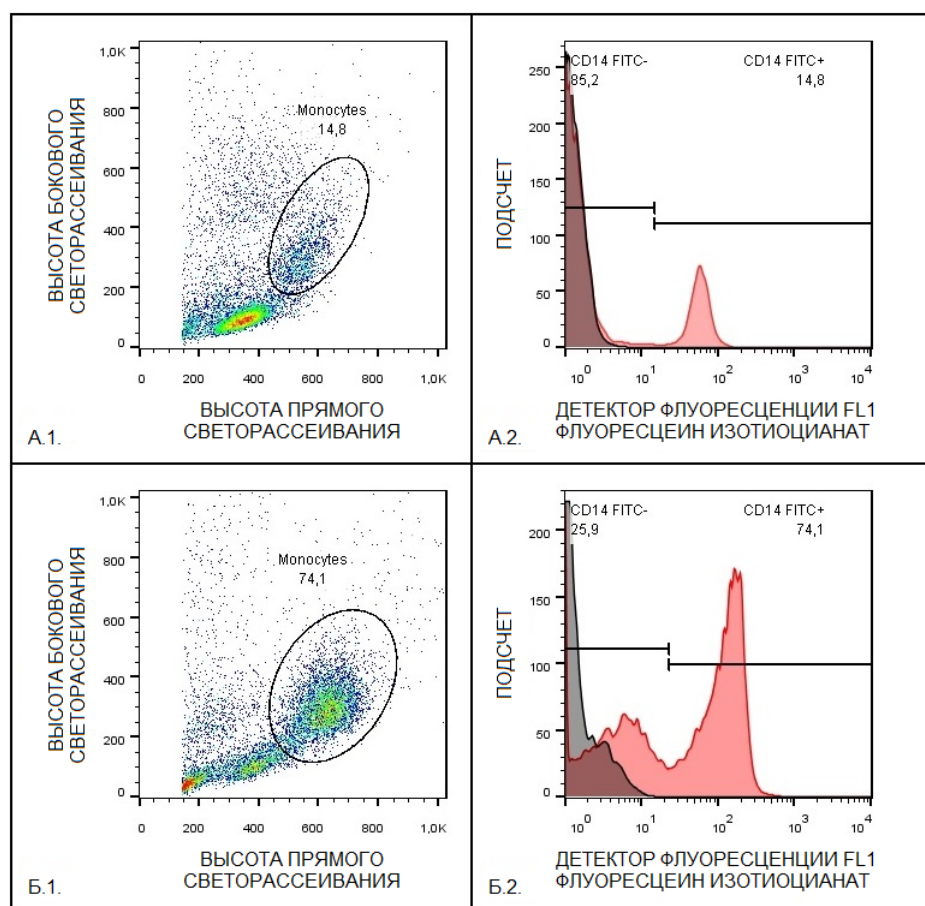


Рисунок 1. Этапы выделения моноцитов. А.1. Первичный анализ популяций лейкоцитов с помощью диаграммы прямого и бокового светорассеяния (SS – FS) после выделения в градиенте фикола ($\rho = 1.077$ г/мл). А.2. Гистограмма интенсивности флуоресценции флуоресцеин изотиоцианата конъюгированного с моноклональными антителами к мембранному рецептору CD14 в фракции лейкоцитов. Б.1. Анализ популяции моноцитов с помощью диаграммы прямого и бокового светорассеяния (SS – FS), после выделения методом адгезии. Процентное соотношение выделенных моноцитов составляет 74,1 %. Б.2. Гистограмма интенсивности флуоресценции флуоресцеин изотиоцианата конъюгированного с моноклональными антителами к мембранному рецептору CD14 в фракции моноцитов.

реакцию), прямой праймер NOX2 в объеме 1 мкл, обратный праймер NOX2 в объеме 1 мкл, до конечного объема 25 мкл реакционной смеси доводили H_2O («Евроген»). Аналогичные реакционные смеси готовили для референсного гена B2M.

Полимерзную цепную реакцию проводили на приборе CFX96 (CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, «Bio-Rad», США), выставив следующие режимы: предварительная денатурация 1 цикл при 93 °C в течение 3 мин; денатурация /отжиг /элонгация до 40 циклов: денатурация при 93°C в течение 15 с, отжиг праймеров при 61°C в течение 20 с, элонгация (визуализация) при 72°C в течение 30 с на 1 т.п.о. [35].

Расчёт экспрессии гена NOX2 проводили при помощи анализа порогового цикла с использованием эталонного гена B2M по методу $\Delta\Delta CT$ [35, 36].

Статистический анализ

Нормальность распределения полученных данных проверяли критериями Колмогорова-Смирнова и Лиллиефорса, а также критерием Шапиро-Уилка. Для сравнения трех или более групп с нормальным распределением использовали однофакторный дисперсионный анализ с критерием Тьюки. Значение $p < 0.05$ считали значимым.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выделение моноцитов из фракции лейкоцитов является распространенным способом получения очищенных моноцитов для исследований *in vitro*. На первом этапе исследования методом разделения в градиенте плотности фикола ($\rho = 1.077$ г/мл) была получена фракция лейкоцитов с процентным соотношением моноцитов от 5.23 % до 6.21 %, так же наблюдалось повышенное соотношение моноцитов 14.8%. Методом адгезии были получены фракции моноцитов с процентным соотношением 74.1%. Наличие белка CD14, показанное методом проточной цитометрии подтвердило, что полученная фракция содержит моноциты (рис. 1).

Стимуляция РМА вызвала значительное увеличение флуоресценции родамина во всех исследуемых группах (рис. 2: А.1., Б.1., В.1., Г.1.). Базальные уровни флуоресценции (левые части рисунков А.1., Б.1., В.1., Г.1.) демонстрировали низкие уровни генерации АФК в покоящихся клетках, тогда как стимулированные РМА клетки проявляли резкое увеличение флуоресценции (правые части рисунков А.1., Б.1., В.1., Г.1.), свидетельствующее о высокой способности моноцитов реагировать активным дыхательным взрывом на внешние раздражители.

Полученные результаты свидетельствуют о сохранении функциональной активности моноцитов у пациентов,

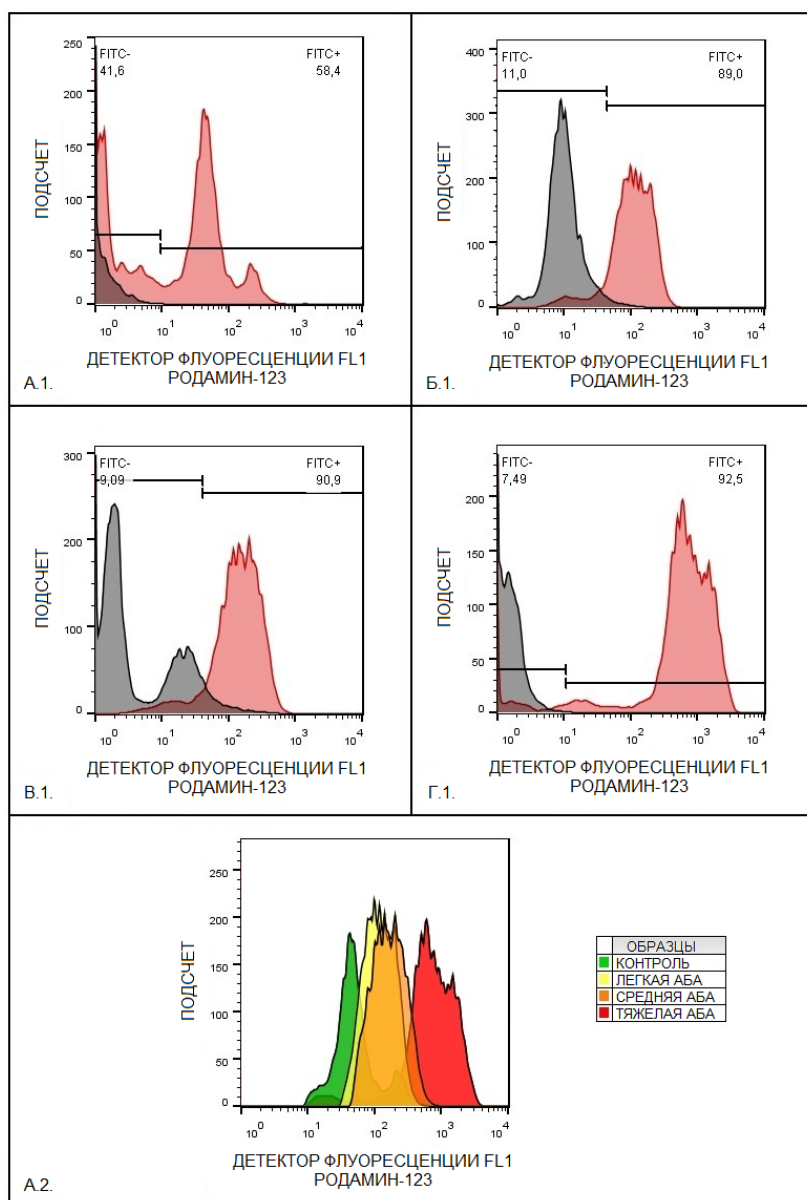


Рисунок 2. А.1. Репрезентативные наложения гистограмм интенсивностей флуоресценции родамина-123 (Rho-123) нестимулированных и активированных РМА (форбол-12-миристан-13-ацетатом) моноцитов здоровых доноров. Б.1. Репрезентативные наложения гистограмм интенсивностей флуоресценции родамина-123 (Rho-123) нестимулированных и активированных РМА (форбол-12-миристан-13-ацетатом) моноцитов пациентов с легкой степенью АБА. В.1. Репрезентативные гистограммы интенсивностей флуоресценции родамина-123 (Rho-123) нестимулированных и активированных РМА (форбол-12-миристан-13-ацетатом) моноцитов пациентов со средней степенью АБА. Г.1. Репрезентативные наложения гистограмм интенсивностей флуоресценции родамина-123 (Rho-123) нестимулированных и активированных РМА (форбол-12-миристан-13-ацетатом) моноцитов пациентов с тяжелой степенью АБА. Флуоресценция Rho-123 измерялась в моноцитах в канале FL1 (рис. 2: А.1., Б.1., В.1., Г.1., левая сторона, без стимуляции РМА), показывает флуоресценцию неоокисленного DHR-123, в то время как стимулированные РМА клетки (рис. 2: А.1., Б.1., В.1., Г.1. правая сторона), показывают резко возросшее количество флуоресценции Rho-123 в результате окисления DHR-123. А.2. Результаты интенсивностей флуоресценции Rho-123 в моноцитах в каждой из групп.

несмотря на индивидуальные вариации базальных и индуцированных уровней активности. Высокая чувствительность моноцитов к стимулу РМА подчёркивает значимость мониторинга их функций при оценке эффективности противовоспалительной терапии и рисков обострения заболеваний.

Анализ интенсивности флуоресценции Rho-123 в моноцитах выявил значительные различия между группами пациентов с различной степенью тяжести atopической бронхиальной астмы (АБА) и контрольной группой здоровых доноров.

Медианное значение флуоресценции канала (FL1) в группе здоровых доноров (контроль) составило $66.46 \pm$

14.56 , тогда как для легкой БА – 119.36 ± 19.24 , для средней БА – 191.84 ± 21.99 , а для группы пациентов с тяжелой БА – 440 ± 153.17 (рис. 3.А.1.) Геометрическое среднее флуоресценции в группе здоровых доноров – 73.5 ± 14.38 , в группе пациентов с легкой БА – 134.44 ± 24.77 ; в группе пациентов со средней БА – 212.33 ± 28.57 ; в группе тяжелой БА – 447.50 ± 146.79 (рис. 3.А.2.).

Обнаружено значимое увеличение медианы флуоресценции Rho-123 в группе пациентов с тяжёлой формой АБА по сравнению с группой здоровых доноров и пациентами с лёгкой степенью АБА, а также по сравнению с группой пациентов со средней степенью АБА ($p < 0.001$).

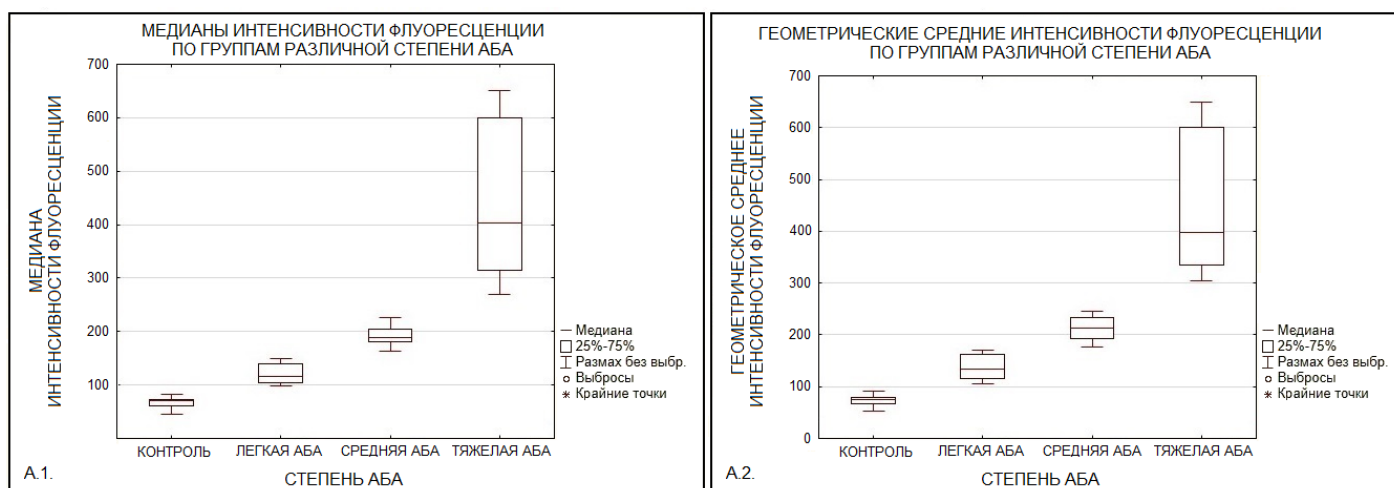


Рисунок 3. Диаграммы медианы (А.1.) и геометрического среднего (gMean) (А.2.) интенсивности флуоресценции Rho-123 активированных РМА моноцитов от здоровых доноров (контроль) и пациентов разной степени тяжести АБА.

Геометрическое среднее интенсивности флуоресценции Rho-123 пациентов со средней степенью АБА было повышено по отношению к контрольной группе ($p < 0.05$), а также меньше по отношению к группе с тяжелой степенью АБА ($p < 0.001$). У пациентов с тяжелой формой АБА выявлен значимый рост геометрического среднего интенсивности флуоресценции по сравнению со всеми исследуемыми группами ($p < 0.001$): контрольная группа, легкая форма АБА и средняя форма АБА.

Эти данные свидетельствуют в пользу того, что тяжесть заболевания коррелирует с увеличением активности моноцитов, что может быть связано с усилением воспалительных процессов и окислительного стресса.

На следующем этапе исследования методом ОТ-ПЦР были определены уровни экспрессии гена NOX2 (рис. 4).

Анализ экспрессии гена NOX2 в моноцитах выявил значительные различия между группами пациентов с различной степенью тяжести атопической бронхиальной астмы (АБА) и контрольной группой здоровых доноров.

В моноцитах здоровых доноров (контроль) относительный уровень экспрессии NOX2 составил 0.177379 ± 0.096110 , в группе с легкой АБА – 0.621562 ± 0.075649 , в группе со средней АБА – 0.836449 ± 0.077394 , в группе с тяжелой астмой – 1.483824 ± 0.411264 . При этом выявлено статистически значимое повышение экспрессии гена NOX2 у пациентов со средней и тяжелой степенью АБА по сравнению с пациентами остальных групп: среднее значение показателя в группе средней степени значимо отличалось от контроля, группы легкой степени и группы тяжелой степени; аналогично, показатель в группе тяжелой степени был выше значений контрольной группы, группы легкой степени и группы средней степени ($p < 0.001$).

Результаты свидетельствуют о том, что тяжесть заболевания коррелирует с увеличением экспрессии NOX2, что может быть связано с усилением воспалительных процессов и окислительного стресса.

ОБСУЖДЕНИЕ

В нашей работе было обнаружено РМА-зависимое увеличение продукции АФК моноцитами больных АБА с

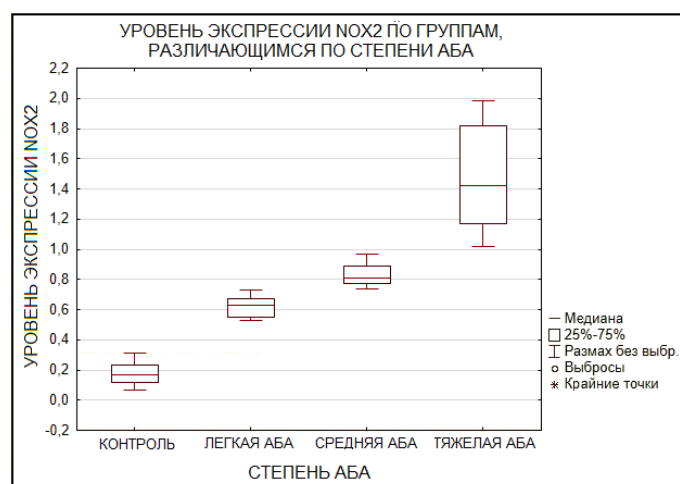


Рисунок 4. Диаграмма уровней экспрессии NOX2 в моноцитах здоровых доноров (контроль) и пациентов разной степени тяжести АБА определенное методом ОТ-ПЦР.

увеличением отягощенности степени тяжести заболевания (рис. 2, 3). Повышенный уровень АФК вызывает усиление окислительного стресса и нарушение процессов аутофагии, что ведет к ухудшению состояния пациентов. Окислительный стресс усиливается при тяжелой астме и во время обострений, что в свою очередь приводит к воспалению и гиперреактивности дыхательных путей. Повышенная экспрессия гена NOX2, показанная методом ОТ-ПЦР (рис. 4), в моноцитах пациентов с астмой может способствовать этому явлению.

Ранее нами [37] было установлено снижение экспрессии белка Rubicon в моноцитах пациентов с астмой тяжелой формы, в том числе нарушение протекания LC3-ассоциированного фагоцитоза. С учетом того, что белок Rubicon взаимодействует с компонентами комплекса NOX2, поддерживая стабильность и функциональную активность этого ферментативного комплекса [38], низкая экспрессия белка Rubicon и гиперэкспрессия NOX дополнительно усугубляют воспалительные процессы и повышают риски развития серьезных патологических изменений.

В совокупности полученные данные позволяют предположить, что гиперэкспрессия NOX2 отрицательно влияет на LC3-ассоциированный фагоцитоз (LAP), снижая

возможности ликвидации патогенов и ослабляя общую иммунокомпетентность.

Представленные результаты обосновывают необходимость разработки терапевтических стратегий, ориентированных на регулирование активности NOX2 и оптимизацию контроля воспалительных процессов. Такие подходы включают применение антиоксидантов и ингибиторов NOX2 для уменьшения уровней АФК, использование препаратов, нормализующих активность LC3-ассоциированного фагоцитоза (например, аналогов АТФ и модуляторов NF-κB), а также совершенствование представлений о взаимодействии NOX2 с другими сигнальными каскадами для создания таргетных лекарственных средств.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование было проведено в полном соответствии с действующими этическими стандартами и принципами биоэтики. Все использованные образцы (фракции лейкоцитов) были предоставлены Казанским научно-исследовательским институтом эпидемиологии и микробиологии. Исследование выполняли согласно внутренним правилам и процедурам института, включая требования к безопасности и конфиденциальности данных. Все процедуры проводили в строгом соответствии с нормативными актами и регламентами, регулирующими проведение научных исследований в области биологии и медицины в Российской Федерации.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках программы «Стратегическое академическое лидерство Казанского федерального университета» (ПРИОРИТЕТ-2030).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mak, J.C., Leung, H.C., Ho, S.P., Law, K.W.B., Lam, W.K., Tsang, K.W.T., Ip, M.S.M., Chan-Yeung, M. (2004) Systemic oxidative and antioxidative status in Chinese patients with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **114**(2), 260–264. DOI: 10.1016/j.jaci.2004.05.013
2. Sweet, M.J., Ramnath, D., Singhal, A., Kapetanovic, R. (2024) Inducible antibacterial responses in macrophages. *Nature Reviews Immunology*, **25**(2), 92–107. DOI: 10.1038/s41577-024-01080-y
3. Ibragimov, B.R., Skibo, Yu.V., Abramova, Z.I. (2023) Autophagy and LC3-associated phagocytosis: similarities and differences. *Medical Immunology (Russia)*, **25**(2), 233–252. DOI: 10.15789/1563-0625-AAL-2569
4. Kim, B.H., Shenoy, A.R., Kumar, P. (2011) A family of IFN-gamma-inducible 65-kD GTPases protects against bacterial infection. *Science*, **332**(6030), 717–721. DOI: 10.1038/ni1426
5. 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. (2009) Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat. Cell Biol.*, **11**(4), 385–396. DOI: 10.1038/ncb1846
6. Qu, J., Li, Y., Zhong, W., Gao, P., Hu, C.J. (2002) Recent developments in the role of reactive oxygen species in allergic asthma. *J. Thorac. Dis.*, **9**(1), E32–E43. DOI: 10.21037/jtd.2017.01.05
7. Michaeloudes, C., Abubakar-Waziri, H., Lakhdar, R., Raby, K., Dixey, P., Adcock, I.M., Mumby, S., Bhavsar, P.K., Chung, K.F. (2022) Molecular mechanisms of oxidative stress in asthma. *Molecular Aspects of Medicine*, **85**,

- e101026. DOI: 10.1016/j.mam.2021.101026
8. Ravikumar, B., Moreau, K., Jahreiss, L., Puri, C., Rubinsztein, D.C. (2010) Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nature Cell Biology*, **12**(8), 747–757. DOI: 10.1038/ncb2078
9. Ammar, M., Bahloul, N., Amri, O., Omri, R., Ghazzi, H., Kammoun, S., Zeghal, K., Mahmoud, L.B. (2022) Oxidative stress in patients with asthma and its relation to uncontrolled asthma. *J. Clin. Lab. Anal.*, **36**(5), e24345. DOI: 10.1002/jcla.24345
10. Karadogan, B., Beyaz, S., Gelincik, A., Buyukozturk, S., Arda, N. (2022) Evaluation of oxidative stress biomarkers and antioxidant parameters in allergic asthma patients with different level of asthma control. *J. Asthma*, **59**(4), 663–672. DOI: 10.1080/02770903.2020.1870129
11. Nadeem, A., Chhabra, S.K., Masood, A., Raj, H.G. (2003) Increased oxidative stress and altered levels of antioxidants in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **111**(1), 72–78. DOI: 10.1067/mai.2003.17
12. Asrar, A., Shameem, M., Husain, Q. (2012) Relation of oxidant antioxidant imbalance with disease progression in patients with asthma. *Ann. Thorac Med.*, **7**(4), 226–232. DOI: 10.4103/1817-1737.102182
13. Anes, A.B., Nasr, H.B., Fetoui, H., Bchir, S., Chahdoura, H., Yacoub, S., Garrouch, A., Benzarti, M., Tabka, Z., Chahed, K. (2015) Alteration in systemic markers of oxidative and antioxidative status in Tunisian patients with asthma: relationships with clinical severity and airflow limitation. *J. of Asthma*, **53**(3), 227–237. DOI: 10.3109/02770903.2015.1087559
14. Asare, P.F., Hurtado, P.R., Tran, H.B., Perkins, G.B., Roscioli, E., Hodge, S. (2023) Reduction in Rubicon by cigarette smoke is associated with impaired phagocytosis and occurs through lysosomal degradation pathway. *Clinical and Experimental Medicine*, **23**(7), 4041–4055. DOI: 10.1007/s10238-023-01105-1
15. Levy, M.L., Bacharier, L.B., Bateman, E., Boulet, L.P., Brightling, C., Buhl, R., Brusselle, G., Cruz, A.A., Drazen, J.M., Duijts, L., Fleming, L., Inoue, H., Ko, F.W.S., Krishnan, J.A., Mortimer, K., Pitrez, P.M., Sheikh, A., Yorgancıoğlu, A., Reddel, H.K. (2023) Key recommendations for primary care from the 2022 Global Initiative for Asthma (GINA) update. *N.P.J. Prim. Care Respir. Med.*, **33**(1), 7. DOI: 10.1038/s41533-023-00330-1
16. Gassan, D.A., Kotova, O.O., Naumov, D.E., Sugaylo, I.Yu., Gorchakova, Y.G., Sinyuk, A.A. (2020) Comparative characteristics of monocytes isolation conditions by adhesion method for in vitro experiments. *Bulletin Physiology and Pathology of Respiration*, **78**, 128–134. DOI: 10.36604/1998-5029-2020-78-128-134
17. Treves, A.J., Yagoda, D., Haimovitz, A., Ramu, N., Rachmilewitz, D., Fuks, Z. (1980) The isolation and purification of human peripheral blood monocytes in cell suspension. *J. Immunol.*, **39**(2), 71–80. DOI: 10.1016/0022-1759(80)90295-1
18. Yang, Y., Zhang, G., Yang, T., Gan, J., Xu, L., Yang, H. (2018) A flow-cytometry-based protocol for detection of mitochondrial ROS production under hypoxia. *Star Protocols*, **2**(2), e100466. DOI: 10.1016/j.xpro.2021.100466
19. Assing, K., Laursen, C.B., Campbell, A.J., Beck, H.C., Davidsen, J.R. (2024) Proteome and dihydrodramine profiling of bronchoalveolar lavage in patients with chronic pulmonary aspergillosis. *J. Fungi*, **10**(5), 314. DOI: 10.3390/jof10050314
20. Richardson, M.P., Ayliffe, M.J., Helbert, M., Davies, E.G. (1998) A simple flow cytometry assay using dihydrodramine for the measurement of the neutrophil respiratory burst in whole blood: comparison with the quantitative nitrobluetetrazolium test. *Journal of Immunological Methods*, **219**(1), 187–193. DOI: 10.1016/S0022-1759(98)00136-7
21. Pioch, J., Blomgran, R. (2022) Optimized flow cytometry protocol for dihydrodramine 123-based detection of reactive oxygen species in leukocyte subpopulations in whole blood. *Journal of Immunological Methods*, **507**, e113308. DOI: 10.1016/j.jim.2022.113308
22. Vernon, P.J., Schaub, L.J., Dallelucca, J.J., Pusateri, A.E., Sheppard, F.R. (2015) Rapid detection of neutrophil oxidative burst capacity is predictive of whole blood cytokine responses. *PLoS One*, **10**(12), 663–672. DOI: 10.1371/journal.pone.0146105
23. Johnstone, A.M., Koh, A., Goldberg, M.B., Glogauer, M. (2007) A hyperactive neutrophil phenotype in patients with refractory periodontitis. *J. Periodontol.*, **78**(9), 1788–1794. DOI: 10.1902/jop.2007.070107
24. Siddiqi, M., Garcia, Z.C., Stein, D.S., Denny, T.N., Spolarics, Z. (2001) Relationship between oxidative burst activity and CD11b expression in neutrophils and monocytes from healthy individuals: Effects of race and gender. *Cytometry*, **46**(4), 243–246. DOI: 10.1002/cyto.1134
25. Bylund, J.J., Brown, K.L., Movitz, C., Dahlgren, C., Karlsson, A. (2010) Intracellular generation of superoxide by the phagocyte NADPH oxidase: how, where, and what for? *Free Radic. Biol. Med.*, **49**(12), 1834–1845. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.016
26. Kavianpour, M., Moradzadeh, K., Muhammadnejad, S., Jabbarpour, Z., Khorsand, A.A., Aghayan, S., Vasei, M., Verdi, J. (2022) Flow cytometric measurement of reactive oxygen species to assess the effects of preconditioning total body irradiation on NOG mice. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, **23**(2), 383–382. DOI: 10.31557/APJCP.2022.23.2.383
27. Quach, A., Glowik, S., Putty, T., Ferrante, A. (2019) Delayed blood processing leads to rapid deterioration in the measurement of the neutrophil respiratory burst by the dihydrodramine-123 reduction assay. *Cytometry B Clin. Cytom.*, **96**(5), 389–396. DOI: 10.1002/cyto.b.21767

28. Chang, S.C., Rodrigues, N.P., Zurgil, N., Henderson, J.R., Bedioui, F., McNeil, C.J., Deutsch, M. (2005) Simultaneous intra- and extracellular superoxide monitoring using an integrated optical and electrochemical sensor system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **327**(4), 979–984. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.12.108
29. Ghasemzadeh, M., Hosseini, E. (2017) Platelet granule release is associated with reactive oxygen species generation during platelet storage: A direct link between platelet pro-inflammatory and oxidation states. *Thromb. Res.*, **156**(5), 101–104. DOI: 10.1016/j.thromres.2017.06.016
30. Vernon, P.J., Paredes, R.M., Sooter, A.J., Schaub, L.J., Grossman, H.M., Pusateri, A.E., Glaser, J.J., Sheppard, F.R. (2016) Severe hemorrhagic shock induces acute activation and expansion of IL-8+/IL-10+ neutrophils with enhanced oxidative reactivity in non-human primates. *Shock*, **46**(3), 129–136. DOI: 10.1097/SHK.0000000000000643
31. Hastuti, S.D., Quach, A., Costabile, M., Barton, M.D., Pyecroft, S.B., Ferrante A. (2019) Measuring the Asian seabass (*Lates calcarifer*) neutrophil respiratory burst activity by the dihydrorhodamine-123 reduction flow cytometry assay in whole blood. *Fish Shellfish Immunol.*, **92**(5), 871–880. DOI: 10.1016/j.fsi.2019.07.018
32. Djiaideu, P., Azzouz, D., Khan, M.A., Kotra, L.P., Swezey, N., Palaniyar, N. (2017) Ultraviolet irradiation increases green fluorescence of dihydrorhodamine (DHR-123): false-positive results for reactive oxygen species generation. *Pharmacol. Res. Perspect.*, **5**(2), e00303. DOI: 10.1002/prp2.303
33. Wardman, P. (2008) Methods to measure the reactivity of peroxynitrite-derived oxidants toward reduced fluoresceins and rhodamines. *Methods Enzymol.*, **441**, 261–282. DOI: 10.1016/S0076-6879(08)01214-7
34. Vowells, S.J., Sekhsaria, S., Malech, H.L., Shalit, M., Fleisher, T.A. (1995) Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes. *J. Immunol. Methods*, **178**(1), 89–97. DOI: 10.1016/0022-1759(94)00247-t
35. Tichopad, A., Dilger, M., Schwarz, G., Pfaffl, M.W. (2003) Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Res.*, **31**(20), e122. DOI: 10.1093/nar/gng122
36. Bantula, M., Arismendi, E., Picado, C., Mullol, J., Roca-Ferrer, J., Tubita, V. (2022) Reference Gene Validation for RT-qPCR in PBMCs from Asthmatic Patients with or without Obesity. *Methods Protoc.*, **5**(3), E35. DOI: 10.3390/mps5030035
37. Ibragimov, B.R., Skibo, Yu.V., Reshetnikova, I.D., Abramov, S.N., Daminova, A.G., Evtyugin, V.G., Abramova Z.I. (2024) Effect of the Rubicon protein on LC3-associated phagocytosis by monocytes in the patients with severe atopic bronchial asthma. *Medical Immunology (Russia)*, **26**(6), 1213–1222. DOI: 10.15789/1563-0625-EOT-2868
38. Wong, S., Payel Sil, P., Martinez, J. (2017) Rubicon: LC3-associated phagocytosis and beyond. *The FEBS journal*, **285**(8), 1379–1388. DOI: 10.1111/febs.14354

Поступила: 10.04.2025

После доработки: 12.09.2025

Принята к публикации: 15.09.2025

ASSOCIATION OF NADPH-OXIDASE 2 (NOX2) WITH THE DEVELOPMENT OF ATOPIC ASTHMA

B.R. Ibragimov^{1*}, A.S. Demertsidis¹, I.D. Reshetnikova^{1,2}, Yu.V. Skibo¹, S.N. Abramov¹, Z.I. Abramova¹

¹Kazan (Volga Region) Federal University, Kremlevskaya st. 18; Kazan, 420008 Russia; *e-mail: Ibragimov94@inbox.ru

²Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan

Phagocytic cells destroy bacteria, allergens, and apoptotic cells via antimicrobial reactions coupled with phagocytosis, including generation of reactive oxygen species (ROS) and delivery of hydrolytic enzymes from lysosomes to the phagosome. ROS produced by NADPH oxidase 2 (NOX2), are involved in the mechanism of LC3-associated phagocytosis; they participate in the development of innate and adaptive immune responses, leading to airway remodeling and hyperreactivity. The aim of this study was to investigate an association between NOX2 and the severity of atopic bronchial asthma (ABA). The level of ROS was determined in monocytes of healthy donors and patients with atopic bronchial asthma using dihydrorhodamine 123 (DHR-123). The expression level of NOX2 gene in monocytes of healthy donors and patients with atopic bronchial asthma was analyzed by RT-PCR. In the presence of PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate), there was a significant increase in rhodamine-123 (Rho-123) fluorescence in all studied groups. At the same time, a significant increase in the median of Rho-123 fluorescence was found in the group with severe ABA as compared to healthy donors and patients with mild ABA, as well as to the group of patients with moderate ABA. A significant increase in NOX2 gene expression was found in the groups with moderate and severe ABA compared to the other studied groups. Based on the data obtained, it can be assumed that with an increase in the activity of NOX2, the key enzyme of LC3-associated phagocytosis, there is an aggravation of the course of ABA.

Key words: NADPH-oxidase 2 (NOX2); LC3-associated phagocytosis; monocytes; atopic bronchial asthma

FUNDING

The work was carried out within the framework of the program «Strategic Academic Leadership of Kazan Federal University» (PRIORITY-2030).

Received: 10.04.2025, revised: 12.09.2025, accepted: 15.09.2025