ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 571.27

Участие нерецепторных тирозинкиназ Src-семейства в образовании нейтрофильных внеклеточных ловушек

Н.В. Воробьева*

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

**e-mail: nvvorobjeva@mail.ru*

Нейтрофилы высвобождают деконденсированный ядерный хроматин или нейтрофильные внеклеточные ловушки (NET, от Neutrophil Extracellular Trap) в ответ на большое количество разнообразных физиологических и фармакологических стимулов. Однако, кроме участия в защите хозяина от инфекции, NET играют важную роль в патогенезе аутоиммунных, воспалительных и злокачественных заболеваний. В этой связи понимание молекулярных механизмов образования NET, ведущее, как правило, к гибели нейтрофилов (NETоз), крайне важно для обеспечения контроля возможного аберрантного или избыточного выброса хроматина. Киназы Src-семейства (Src-киназы) представляют собой нерецепторные тирозиновые киназы, участвующие в разнообразных функциях организма человека. Однако их роль в NETозе и окислительном взрыве изучена недостаточно. У нейтрофилов человека описано три представителя Src-киназ (Hck, Fgr и Lyn), и в нашей работе был изучен их вклад в NETоз и окислительный взрыв с использованием ингибиторного анализа. Мы показали, что Src-киназы участвуют в окислительном взрыве и NETозе, индуцированных кальциевым ионофором A23187, но не участвуют в этих эффекторных функциях при стимуляции нейтрофилов миметиком диацилглицерола форбол-12-миристат-13-ацетатом (ФМА).

Ключевые слова: *нейтрофилы человека, нейтрофильные внеклеточные ловушки, NET, окислительный взрыв, Src-киназы*

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-1-2

Нейтрофильные внеклеточные ловушки (NET, от Neutrophil Extracellular Trap) представляют собой паутиноподобные структуры, состоящие из остова деконденсированного ядерного хроматина, покрытого гистонами, противомикробными белками гранул и цитозольными белками [1, 2]. Впервые NET были описаны и всесторонне изучены в лаборатории Артуро Циклински, а в 2004 г. появилась первая публикация [1], в которой их образование было представлено как новая эффекторная функция нейтрофилов, направленная на уничтожение и ограничение распространения патогенов в очаге воспаления. Было также установлено, что процесс образования NET сопровождается гибелью нейтрофила, и эта форма программируемой клеточной смерти была названа NETозом [3].

Впоследствии обнаружили, что, помимо защитной функции, NET играют существенную роль в патогенезе аутоиммунных, воспалительных и онкологических заболеваний [4–7]. В связи с этим понимание сигнальных путей, ведущих к образованию нейтрофильных ловушек, крайне важно для обеспечения контроля последствий их нерегулируемого или избыточного образования.

Классический, или «суицидальный», NETоз представляет собой многостадийный процесс, включающий активацию, образование активных форм кислорода (АФК) ферментным комплексом НАДФН-оксидазой, диссоциацию под действием АФК азуросом – белковых комплексов, расположенных в мембранах азурофильных гранул [8], выход из азуросом сериновых протеаз (нейтрофильной эластазы – НЭ, катепсина G и азуроцидина) и миелопероксидазы (МПО) в цитоплазму, а затем их миграцию в ядро. В ядре при участии НЭ и МПО, а также пептидил-аргининдеиминазы 4, цитруллинирующей гистоны, происходят деконденсация ядерного хроматина и его последующий выброс за пределы клетки, или NETоз [1]. Помимо перечисленных ключевых факторов NETоза, в сигнальных путях передачи информации от первичного акцептора сигнала и до образования NET принимает участие большое количество других ферментов, например, протеинкиназа C [9], циклин-зависимые киназы 4 и 6 [10], сигнальный каскад Raf-MEK-ERK, а также нерецепторные тирозиновые киназы Src-семейства (Src-киназы).

У человека было обнаружено 9 представителей тирозиновых Scr-киназ: Src, Yes, Fgr, Fyn, Lyn, Hck, Lck, Blk и Frk, а также сходные с ними по структуре Src-подобные киназы: Brk, Srm, FrK и Bsk. Все эти киназы контролируют в организме множество функций, например, иммунный ответ, клеточную адгезию, хемотаксис, ремоделирование цитоскелета, апоптоз, генную экспрессию и др. [11, 12]. В нейтрофилах человека в настоящее время описана экспрессия трех представителей Src-киназ – Hck, Fgr и Lyn. С использованием мышей, нокаутных по генам, кодирующим киназы Hck и Fgr, было показано их участие в контроле экзоцитоза гранул [13]. Кроме того, с использованием трансгенных мышей установлено участие Hck и Fgr в регуляции окислительного взрыва через фосфорилирование фактора обмена гуаниновых нуклеотидов малых ГТФаз, Vav1, участвующего в активации Rac1 и Rac2 [14]. Вместе с тем, было показано, что ингибитор ГТФазы Rac, NSC23766, не оказывает подавляющего действия на форбол-12-миристат-13-ацетат (ФМА)- и fMLP (*N*-Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine)-индуцированный окислительный взрыв, несмотря на значительное снижение экспрессии Rac в нейтрофилах [15]. Эти факты свидетельствуют о том, что сборка и активация НАДФН-оксидазы может происходить и без ГТФ-связанных форм белка Rac.

Участие Src-киназ в регуляции NETоза было исследовано в единственной работе [16], в которой продемонстрировали образование NET нейтрофилами человека в ответ на компонент клеточной стенки дрожжей β-глюкан и, параллельно, активацию экспрессии Src-киназ в сигнальном пути, предшествующем генерации АФК НАДФН-оксидазой. Однако данные об участии Src-киназ в окислительном взрыве и NETозе нейтрофилов человека, стимулированных другими физиологическими и фармакологическими стимулами, практически отсутствуют. В настоящей работе впервые было изучено влияние Src-киназ на окислительный взрыв и NETоз нейтрофилов человека, активированных ионофором кальция A23187 и форболовым эфиром ФМА.

Материалы и методы

Реагенты. ФМА, A23187, fMLP, 4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3, 4-d] pyrimidine (PP2), диметилсульфоксид и люминол были приобретены в компании Sigma-Aldrich (США). Краситель SYBR Green и смола ProLong Gold были закуплены в Thermo Fisher Scientific (Invitrogen, США).

Выделение первичных нейтрофилов человека. Все исследования с кровью проводили в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации 2000 г. и протоколом Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г. Образцы крови были получены с добровольного согласия доноров в отделении переливания крови Российской детской клинической больницы ФГБОУ ВО «Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова» Минздрава России. Периферическую кровь здоровых доноров или пациентов с хронической гранулематозной болезнью (ХГБ) забирали в утренние часы натощак в полипропиленовые пробирки с гепарином. Нейтрофилы выделяли с помощью центрифугирования в одноступенчатом градиенте плотности Ficoll-Hypaque (плотность 1,077 г/см^3) в течение 25 мин при 400g и комнатной температуре, как описано ранее [17]. Основную массу эритроцитов удаляли путем седиментации в декстране. Оставшиеся эритроциты лизировали в гипотоническом растворе хлорида натрия (0,2%-ный NaCl) в течение 30 с и далее восстанавливали изотоничность путем добавления 1,6%-ного NaCl. Нейтрофилы ресуспендировали в полной культуральной среде (ПКС), включающей RPMI 1640, 10 мМ HEPES, 2 мМ L-глутамина и 1%-ную инактивированную эмбриональную телячью сыворотку. Полученные клетки были представлены на 98% гранулоцитами, а их жизнеспособность составляла не менее 99%, что определяли по исключению 0,1%-ного трипанового синего.

Оценка люминол-зависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ). ЛЗХЛ использовали для оценки суммарных АФК (внутри- и внеклеточных), как описано ранее [18]. Свежевыделенные нейтрофилы в концентрации $2,5 \times 10^6$ клеток/мл ($4,5 \times 10^5$ клеток) инкубировали в присутствии ингибитора Src-киназ PP2 в возрастающих концентрациях в течение 30 мин в условиях 37°C и 5% CO_2 в ПКС. Далее ПКС заменяли на фосфатный буфер Кребса-Рингера (120 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1,7 мМ KH_2PO_4, 8,3 мМ Na_2HPO_4, 10 мМ глюкоза, 1 мМ $CaCl_2$, 1,5 мМ $MgCl_2$, pH 7,3). К 2×10^5 клеток добавляли 80 мкМ люминола и проводили стимуляцию окислительного взрыва 2 мкМ A23187, 30 нМ ФМА или 800 нМ fMLP. ЛЗХЛ анализировали сразу после стимуляции в течение 30 мин при 37°C в планшетном хемилюминометре Lucy 1 (Anthos Labtec, Австрия). Оценивали площадь, занимаемую кривыми ЛЗХЛ, и выражали степень окислительного взрыва в процентах от контроля (контроль: стимулированные нейтрофилы, 100%) в виде гистограмм.

Индукция и флуоресцентное окрашивание NET. Для обнаружения NET использовали флуоресцентную микроскопию. Свежевыделенные нейтрофилы (2×10^5 клеток/мл в 500 мкл ПКС), адгезированные на круглых покровных стеклах, находящиеся в лунках 24-луночного планшета, инкубировали с PP2 в течение 30 мин при 37°C и 5% CO_2. Образование NET индуцировали 30 нМ ФМА или 2 мкМ A23187 в течение 2 ч 40 мин и 4 ч соответственно. После стимуляции NETоза клет-

ки фиксировали в лунках в 4%-ном растворе параформальдегида в течение 15 мин. Препараты окрашивали SYBR Green в течение 7 мин при комнатной температуре в темноте, далее погружали в смолу ProLong Gold. Клетки анализировали с использованием флуоресцентного микроскопа Leica DM LB (Leica Microsystems, Германия), а фотографирование проводили с помощью камеры Leica DC300F. Подсчитывали общее количество клеток и количество нетотических клеток в каждом поле зрения, затем оценивали процент NETоза в нескольких полях зрения.

Статистическая обработка. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы GraphPad InStat 3.06 (GraphPad Software, США). Сравнение между несколькими экспериментальными группами проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA), сопровождаемого тестом множественного сравнения Бонферрони. Данные в тексте и на рисунках представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего. Различия считали статистически значимыми при $p < 0{,}001$.

Результаты и обсуждение

Чтобы выяснить, зависит ли NETоз нейтрофилов человека, активированных A23187 и ФМА, от Src-киназ, был применен специфический неселективный ингибитор PP2. Действие PP2 также оценивали на модели окислительного взрыва, индуцированного A23187, ФМА и хемоаттрактантом fMLP, методом регистрации ЛЗХЛ, как описано в разделе «Материалы и методы».

На рис. 1 можно видеть, что инкубация нейтрофилов с PP2 в возрастающих концентрациях приводила к значительному и дозозависимому подавлению окислительного взрыва, индуцированного A23187 (А) и fMLP (В), но не ФМА (Б). NETоз, стимулированный A23187, был также эффективно и дозозависимо подавлен PP2 (рис. 2А, В), что указывает на его зависимость от активации Src-киназ. Однако ФМА-индуцированный NETоз был нечувствителен к действию PP2 (рис. 2Б, В), что коррелировало с действием ингибитора в ответ на окислительный взрыв.

Мы предположили, что Src-киназы, помимо активации НАДФН-оксидазы (окислительный взрыв), являющейся неотъемлемым участником классического NETоза, могут активировать и другие субстраты, играющие важную роль в его активации. Для проверки этого предположения мы использовали нейтрофилы, выделенные из крови больных ХГБ, имеющие мутации субъединиц, полностью инактивирующие НАДФН-оксидазу. Такие нейтрофилы не способны генерировать оксидаза-зависимые АФК, а также не образуют NET в ответ на многие стимулы, включая ФМА, однако образуют NET в ответ на A23187 (рис. 2Г). Инкубация нейтрофилов больных ХГБ в присутствии

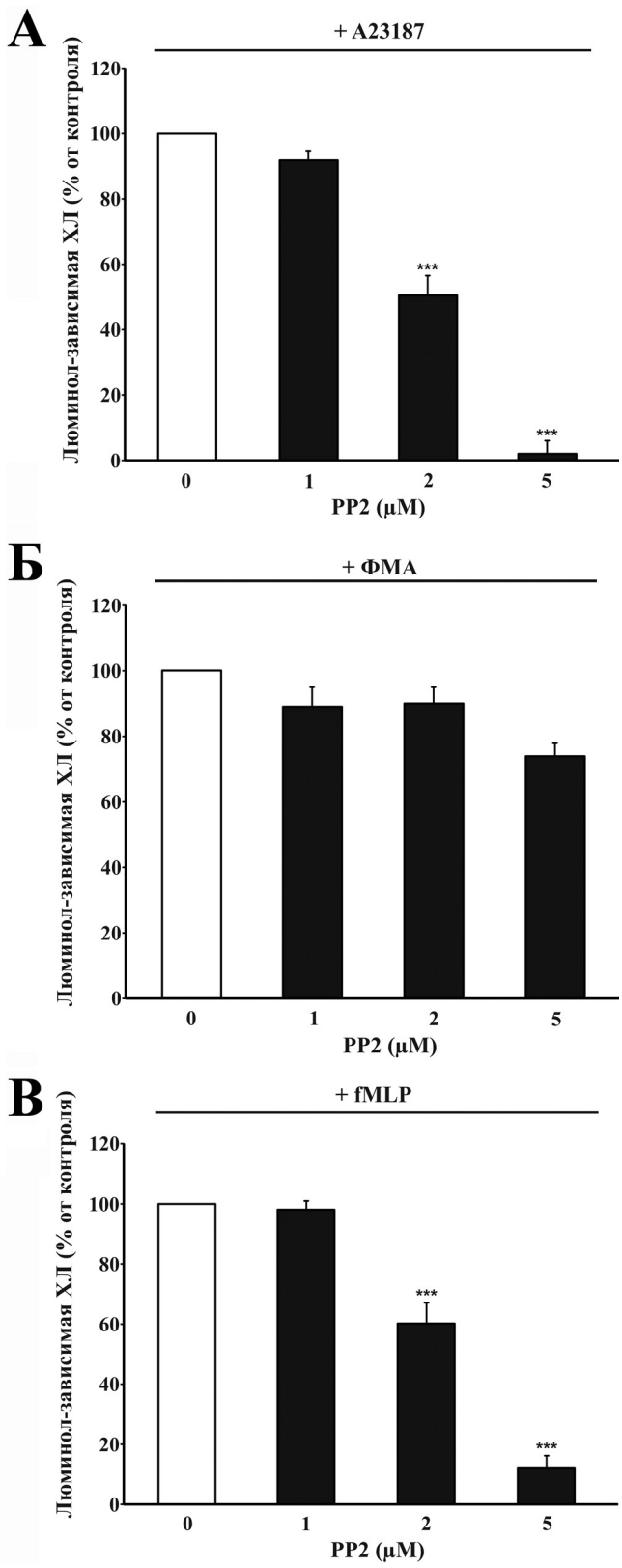

Рис. 1. Оценка участия нерецепторных тирозинкиназ **Src**-семейства в окислительном взрыве нейтрофилов человека.
Нейтрофилы здоровых доноров инкубировали в течение 30 мин в присутствии специфического ингибитора Src-киназ PP2. Окислительный взрыв индуцировали 2 мкМ A23187 (**А**), 30 нМ ФМА (**Б**) или 800 нМ fMLP (**В**) и регистрировали хемилюминесценцию в присутствии 80 мкМ люминола; n = 3; *** – $p < 0{,}001$.
Сокращения на графиках: ХЛ, хемилюминесценция.

PP2 в течение 30 мин не вызывала подавления NETоза, индуцированного A23187 (рис. 2Г). Это указывает на участие Src-киназ только в сигнальном пути активации окислительного взрыва как составляющего звена NETоза, который полностью отсутствует в нейтрофилах больных ХГБ.

Различное действие на NETоз и окислительный взрыв ингибитора Src-киназ PP2 в зависимости от характера стимула (ФМА или A23187) можно бы было объяснить неодинаковой чувствительностью НАДФН-оксидазы к отсутствию в своем составе ГТФ-связанной формы Rac2, активация которой зависит от Src-киназ [14]. Однако трудно объяснить, почему при активации нейтрофилов ФМА отсутствие такой формы Rac2 не влияет на окислительный взрыв и NETоз, а при стимуляции нейтрофилов A23187 – оказывает сильное подавляющее действие.

Мы полагаем, что различная чувствительность к подавлению Src-киназ нейтрофилов человека, стимулированных различными активаторами, обусловлена неодинаковой регуляцией тока Ca^{2+}. Известно, что почти все иммунные реакции нейтрофилов, включая окислительный взрыв и NETоз, на определенной стадии требуют повышения уровня цитоплазматического Ca^{2+}. Ней-

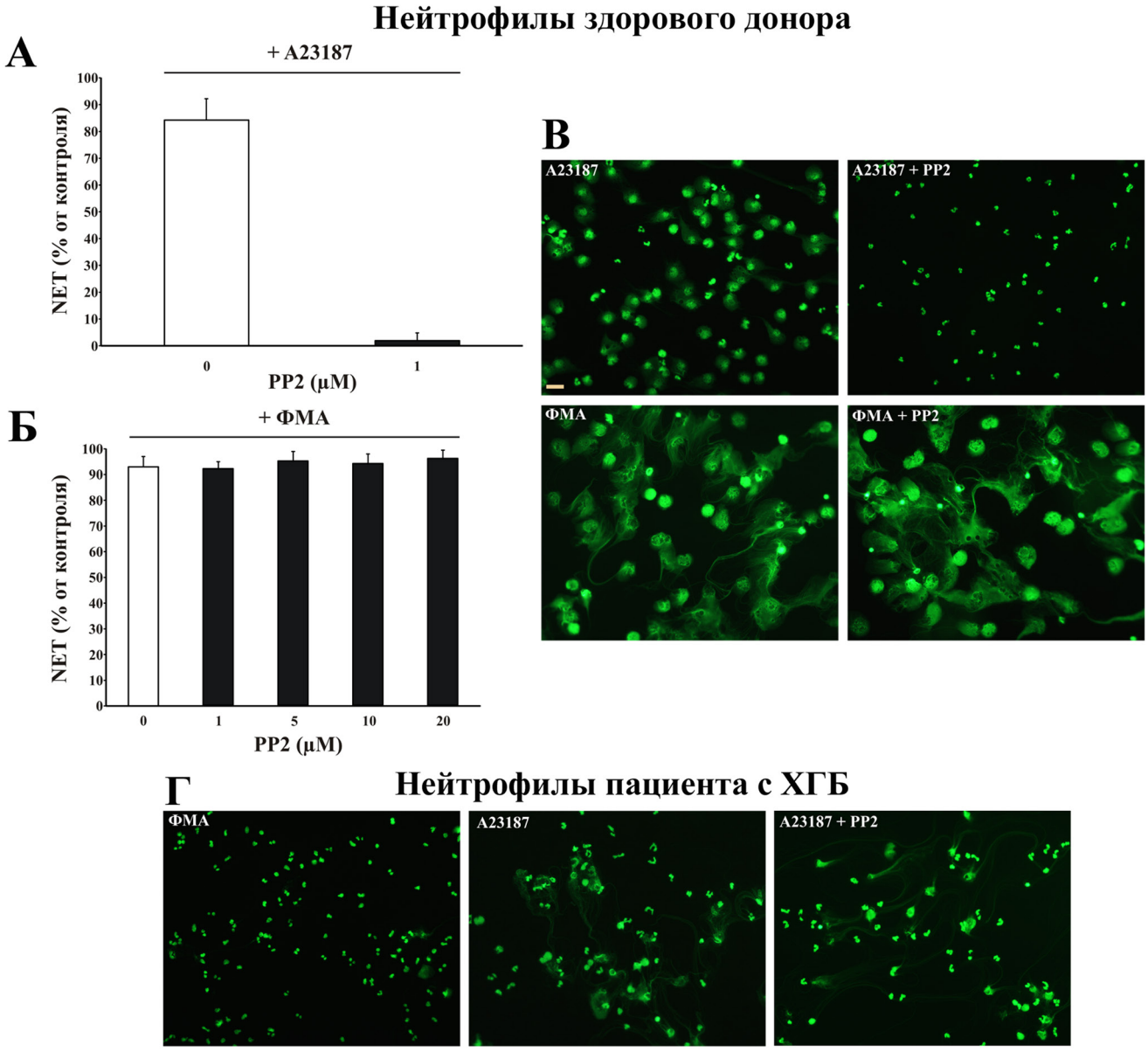

Рис. 2. Оценка участия тирозинкиназ Src-семейства в NETозе нейтрофилов человека.
Для оценки NETоза нейтрофилы здоровых доноров (**А**, **Б**, **В**) и больных хронической гранулематозной болезнью (ХГБ) (**Г**), адгезированные на покровных стеклах, инкубировали с PP2 в течение 30 мин. Образование NET индуцировали 2 мкМ A23187 или 30 нМ ФМА в течение 4 ч и 2 ч 40 мин соответственно. Клетки фиксировали 4%-ным параформальдегидом и окрашивали SYBR Green для визуализации хроматина; n = 3, для нейтрофилов здоровых доноров и нейтрофилов ХГБ; *** – $p < 0{,}001$. Масштаб 25 мкм.
Дозы PP2 в A23187- и ФМА-индуцированных нейтрофилах составляют 1 мкМ и 5 мкМ соответственно (**В** и **Г**).

трофилы как невозбудимые клетки используют для генерации кальциевых сигналов депо-управляемые Ca^{2+}-каналы плазматической мембраны [19], а сенсором, сигнализирующим об истощении Ca^{2+} в эндоплазматическом ретикулуме, являются расположенные в нем белки STIM (Stromal Interaction Molecule). Ранее было показано, что ФМА, в отличие от A23187 и fMLP, не активирует вход внеклеточного Ca^{2+} при активации и депо-управляемые Ca^{2+}-каналы плазматической мембраны не задействованы [20]. Вместе с тем, на модели фибробластов мышей, трансгенных по тирозинкиназе c-Src, было показано участие c-Src в регуляции депо-управляемых Ca^{2+}-каналов [21]. Таким образом, мы допускаем, что тирозинкиназы Src-семейства могут фосфорилировать не только Vav1, но и компоненты кальциевых каналов нейтрофилов человека, чем можно объяснить различие чувствительности к их подавлению при стимуляции разными стимулами. Однако это предположение еще предстоит доказать экспериментально.

Отсутствие чувствительности A23187-индуцированного NETоза к PP2 у нейтрофилов больных ХГБ, вероятно, обусловлено повышенным уровнем цитозольного Ca^{2+} из-за нарушения у них регуляции кальциевого тока [19, 22–25]. Кроме того, у таких клеток многие сигнальные пути зависят от участия АФК не оксидазного, а митохондриального происхождения [17, 23, 26], что делает их нечувствительными к подавлению тока внеклеточного Ca^{2+}.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria // Science. 2004. Vol. 303. N 5663. P. 1532–1535.

2. *Fuchs T.A., Abed U., Goosmann C., Hurwitz R., Schulze I., Wahn V., Weinrauch Y., Brinkmann V., Zychlinsky A.* Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps // J. Cell. Biol. 2007. Vol. 176. N 2. P. 231–241.

3. *Steinberg B.E., Grinstein S.* Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death // Sci. STKE. 2007. Vol. 2007. N 379: pe11.

4. *Vorobjeva N.V., Pinegin B.V.* Neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation and role in health and disease // Biochemistry (Mosc.). 2014. Vol. 79. N 12. P. 1286–1296.

5. *Pinegin B., Vorobjeva N., Pinegin V.* Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity // Autoimmun. Rev. 2015. Vol. 14. N 7. P. 633–640.

6. *Vorobjeva N.V., Chernyak B.V.* NETosis: molecular mechanisms, role in physiology and pathology // Biochemistry (Mosc.). 2020. Vol. 85. N 10. P. 1178–1190.

7. *Vorobjeva N.V.* Neutrophil extracellular traps: new aspects // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2020. Vol. 75. N 4. P. 173–188.

8. *Metzler K.D., Goosmann C., Lubojemska A., Zychlinsky A., Papayannopoulos V.* A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis // Cell. Rep. 2014. Vol. 8. N 3. P. 883–896.

9. *Vorobjeva N., Dagil Y., Pashenkov M., Pinegin B., Chernyak B.* Protein kinase C isoforms mediate the formation of neutrophil extracellular traps // Int. Immunopharmacol. 2022. Vol. 24. N 114: 109448.

10. *Amulic B., Knackstedt S.L., Abu Abed U., Deigendesch N., Harbort C.J., Caffrey B.E., Brinkmann V., Heppner F.L., Hinds P.W., Zychlinsky A.* Cell-cycle proteins control production of neutrophil extracellular traps // Dev. Cell. 2017. Vol. 43. N 4. P. 449–462.e5.

11. *Brian B.F., Freedman T.S.* The Src-family kinase Lyn in immunoreceptor signaling // Endocrinology. 2021. Vol. 162. N 10: bqab152.

12. *Futosi K., Mócsai A.* Tyrosine kinase signaling pathways in neutrophils // Immunol. Rev. 2016. Vol. 273. N 1. P. 121–139.

13. *Fumagalli L., Zhang H., Baruzzi A., Lowell C.A., Berton G.* The Src family kinases Hck and Fgr regulate neutrophil responses to N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine // J. Immunol. 2007. Vol. 178. N 6. P. 3874–3885.

14. *Gao Y., Dickerson J.B., Guo F., Zheng J., Zheng Y.* Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2004. Vol. 101. N 20. P. 7618–7623.

15. *Mitchell T., Lo A., Logan M.R., Lacy P., Eitzen G.* Primary granule exocytosis in human neutrophils is regulated by Rac-dependent actin remodeling // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 2008. Vol. 295. N 5. P. C1354–C1365.

16. *Nanì S., Fumagalli L., Sinha U., Kamen L., Scapini P., Berton G.* Src family kinases and Syk are required for neutrophil extracellular trap formation in response to β-glucan particles // J. Innate Immun. 2015. Vol. 7. N 1. P. 59–73.

17. *Vorobjeva N., Prikhodko A., Galkin I., Pletjushkina O., Zinovkin R., Sud'ina G., Chernyak B., Pinegin B.* Mitochondrial reactive oxygen species are involved in chemoattractant-induced oxidative burst and degranulation of human neutrophils *in vitro* // Eur. J. Cell. Biol. 2017. Vol. 96. N 3. P. 254–265.

18. *Vorobjeva N.V., Pinegin B.V.* Effects of the antioxidants Trolox, Tiron and Tempol on neutrophil extracellular trap formation // Immunobiology. 2016. Vol. 221. N 2. P. 208–219.

19. *Geiszt M., Kapus A., Német K., Farkas L., Ligeti E.* Regulation of capacitative Ca^{2+} influx in human neutrophil granulocytes. Alterations in chronic granulomatous disease // J. Biol. Chem. 1997. Vol. 272. N 42. P. 26471–26478.

20. *Gupta A.K., Giaglis S., Hasler P., Hahn S.* Efficient neutrophil extracellular trap induction requires mobilization of both intracellular and extracellular calcium pools and is modulated by cyclosporine A // PLoS One. 2014. Vol. 9. N 5: e97088.

21. *Babnigg G., Bowersox S.R., Villereal M.L.* The role of pp60c-src in the regulation of calcium entry via store-operated calcium channels // J. Biol. Chem. 1997. Vol. 272. N 47. P. 29434–29437.

22. *Geiszt M., Kapus A., Ligeti E.* Chronic granulomatous disease: more than the lack of superoxide? // J. Leukoc. Biol. 2001. Vol. 69. N 2. P. 191–196.

23. *Vorobjeva N.V., Chernyak B.V.* NADPH oxidase modulates Ca^{2+}-dependent formation of neutrophil extracellular traps // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2020. Vol. 75. N 3. P. 104–109.

24. *Sundqvist M., Christenson K., Björnsdottir H., Osla V., Karlsson A., Dahlgren C., Speert D.P., Fasth A., Brown K.L., Bylund J.* Elevated mitochondrial reactive oxygen species and cellular redox imbalance in human NADPH-oxidase-deficient phagocytes // Front. Immunol. 2017. Vol. 8: 1828.

25. *Song Z., Huang G., Chiquetto Paracatu L., Grimes D., Gu J., Luke C.L., Clemens R.A., Dinauer M.C.* NADPH oxidase controls pulmonary neutrophil infiltration in the response to fungal cell walls by limiting LTB4 // Blood. 2020. Vol. 135. N 12. P. 891–903.

26. *Vorobjeva N., Galkin I., Pletjushkina O., Golyshev S., Zinovkin R., Prikhodko A., Pinegin V., Kondratenko I., Pinegin B., Chernyak B.* Mitochondrial permeability transition pore is involved in oxidative burst and NETosis of human neutrophils // Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis. 2020. Vol. 1866. N 5: 165664.

Поступила в редакцию 14.11.2022
После доработки 26.12.2022
Принята в печать 06.02.2023

RESEARCH ARTICLE

Participation of non-receptor Src family tyrosine kinases in the formation of neutrophil extracellular traps

N.V. Vorobjeva*

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

Neutrophils release decondensed nuclear chromatin or Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in response to a great number of physiological and pharmacological stimuli. However, apart from the host defensive function, NETs play an essential role in the pathogenesis of various autoimmune, inflammatory, and malignant diseases. Therefore, understanding the molecular mechanisms of NETs formation, usually leading to the neutrophil death (NETosis), is important to control the probable aberrant or excessive NETs release. The Src-family kinases (Src-kinases) are non-receptor tyrosine kinases that are involved in a variety of human functions. However, their role in NETosis and oxidative burst has not been sufficiently studied. Since three representatives of Src-kinases (Hck, Fgr, and Lyn) have been described in human neutrophils, we studied their contribution to NETosis and oxidative burst using inhibitory analysis. We have shown that Src-kinases are involved in the oxidative burst and NETosis induced by the calcium ionophore A23187 but not the mimetic of diacylglycerol phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA).

Keywords: *human neutrophils, neutrophil extracellular traps, NETs, oxidative burst, Src kinases*

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

Сведения об авторах

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