

# Кальциевая сигнализация регулирует ретракцию ламеллиподий в хемотактирующих нейтрофилах человека.

## Calcium signaling regulates lamellipodium retraction in human chemotactic neutrophils.

Ю. Д. Коробкина<sup>1#</sup>, А. Н. Свешникова<sup>1,2,3</sup>.

J. D. Korobkina<sup>1#</sup>, A. N. Sveshnikova<sup>1,2,3</sup>.

1. ФГБУН центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, ул. Средняя Калитниковская 30, Москва, Россия, 109029
2. Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия
3. ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, ул. Саморы Машела, 1, Москва, Россия, 117997

# Автор для переписки: [juliajessika@gmail.com](mailto:juliajessika@gmail.com)

1. Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology Russian Academy of Sciences Moscow, 109029, Russia
2. Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia
3. National Medical Research Centre of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev Moscow, 117198, Russia

Получено: 28.02.2024

Принято к публикации: 24.03.2024

Опубликовано: 30.06.2024

EDN: FHEOGY

### Аннотация

Нейтрофилы – ключевые клетки врожденного иммунитета, которые первыми рекрутируются в зону воспаления. Их направленная миграция осуществляется по градиенту хемоаттрактантов, взаимодействующих с внеклеточным матриксом. Важным регулятором перестройки цитоскелета при движении клеток является внутриклеточная кальциевая сигнализация, однако ее роль в управлении направленным движением нейтрофилов человека остается дискуссионной. В данной работе исследована динамика концентрации кальция в цитоплазме нейтрофилов человека, движущихся вблизи растущего тромба. С помощью флуоресцентного индикатора Fura-Red проанализированы характеристики кальциевого сигнала и его связь со скоростью миграции клеток. Полученные результаты демонстрируют существование двух субпопуляций нейтрофилов: быстро движущихся клеток с постоянным низким уровнем кальция и клеток с выраженными кальциевыми колебаниями, демонстрирующих медленный “поисковый” тип миграции. Установлено, что спайки концентрации кальция не коррелируют со скоростью движения, но статистически значимо совпадают с моментами ретракции ламеллиподий, что указывает на их роль в ремоделировании цитоскелета. Выявленные закономерности свидетельствуют о том, что кальциевые сигналы преимущественно регулируют локальные перестройки цитоскелета, тогда как направленный хемотаксис может происходить и при недетектируемых изменениях уровня внутриклеточного кальция.

**Ключевые слова:** Кальциевая сигнализация,

Нейтрофилы, Хемотаксис, Конфокальная микроскопия

### Annotation

Neutrophils are key cells of the innate immune system, which are the first to be recruited to the inflammatory zone. Their directed migration is carried out along a gradient of chemoattractants interacting with the extracellular matrix. Intracellular calcium signaling is an important regulator of cytoskeletal rearrangement during cell movement, but its role in controlling the directional movement of human neutrophils remains controversial. In this work, the dynamics of calcium concentration in the cytoplasm of human neutrophils moving near a growing blood clot is investigated. The characteristics of the calcium signal and its relationship to the rate of cell migration were analyzed using the Fura-Red fluorescent indicator. The results demonstrate the existence of two subpopulations of neutrophils: fast-moving cells with constant low levels of calcium and cells with pronounced calcium fluctuations, demonstrating a slow “search” type of migration. It was found that calcium concentration spikes do not correlate with the speed of movement, but statistically significantly coincide with the moments of lamellipodium retraction, which indicates their role in cytoskeletal remodeling. The revealed patterns indicate that calcium signals predominantly regulate local rearrangements of the cytoskeleton, whereas directional chemotaxis can occur with undetectable changes in intracellular calcium levels.

**Key words:** Calcium signaling, Neutrophils, Chemotaxis, Confocal microscopy

## Введение

Нейтрофилы – первый тип иммунных клеток, рекрутирующийся в места воспаления. Эти клетки представляют собой самую многочисленную популяцию лейкоцитов в крови человека [1]. Для эффективной защиты организма во время воспалительного процесса нейтрофилам необходимо быстро достигать очагов воспаления. [1,2].

Хемотаксис – это управляемое движение клеток, которое происходит в ответ на химические сигналы, исходящие от места повреждения или воспаления – хемоаттрактанты. За пределами сосудистого русла хемоаттрактанты могут ассоциироваться с внеклеточным матриксом и направлять миграцию нейтрофилов к очагам поражения. [3][4].

Нейтрофилы являются основными участниками процесса тромбовоспаления – взаимодействия между системой свертывания крови, иммунной системы и эндотелием [5]. Тромбовоспаление присутствует в различных патофизиологических ситуациях, таких как бактериальная инфекция или рак [6].

Когда тромбоциты активируются на месте повреждения или воспаления, они секретируют гранулы, содержащие такие хемоаттрактанты, как IL-8 [7,8], что привлекает нейтрофилы к месту повреждения. Ранее было показано, что движение нейтрофилов вокруг растущего тромба обусловлено хемотаксисом [9,10].

При миграции по градиентам хемоаттрактанта лейкоцит вступает в повторяющиеся циклы деформации. Сначала происходит рост ламеллиподии на переднем крае клетки с последующей интеграцией и селективно-опосредованной адгезией к подложке. Формирование ламеллиподии на переднем крае зависит от полимеризации и ветвления актина и малых GTP-аз [11,12]. Затем происходит опосредованное актомиозиновыми волокнами сокращение тела клетки и разрыв ранее сформированных сайтов адгезии с продвижением нейтрофила вперед [13].

Все этапы реакции нейтрофилов на воспаление или патогенные микроорганизмы (роллинг, адгезия, хемотаксис и образование внеклеточных ДНК-ловушек (NETоз)) имеют общую особенность: они регулируются кальциевой сигнализацией [14,15].

Также известно, что колебания  $[Ca^{2+}]$  в нейтрофиле могут влиять на организацию цитоскелета, а, значит, и на направленное движение клетки [16–18]. Считается, что кальциевая сигнализация не только необходима для запуска миграции, но и тонко модулирует динамику полимеризации и деполимеризации

актина. Наряду с этим, существует и точка зрения, что в определенных условиях нейтрофилам не всегда требуется значимая мобилизация кальция для направленной миграции [19].

Известно, что в нейтрофилах мыши хемотаксис к таким хемоаттрактантам, как LPS, CXCL<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и C5a, опосредован поднятием концентрации кальция на переднем конце клетки [20]. Такие регуляторы движения нейтрофилов, как PI3K, Rac и Lyp, влияют на хемотаксис путем модуляции амплитуды осцилляций кальция [20,21]. Внутриклеточные импульсы кальция являются универсальными регуляторами подвижности в нейтрофилах мыши, определяя будущее направление формирования псевдоподий [20].

При этом имеющиеся данные по регуляции хемотаксиса нейтрофилов человека ионами кальция противоречивы [15,19]. Также было показано, что нейтрофилы очень чувствительны к сдвиговому напряжению и центрифугированию [22]. При этом большинство распространенных анализов используют выделенные из цельной крови нейтрофилы.

Целью данной работы является наблюдение кальциевой сигнализации в одиночных нейтрофилах человека в процессе миграции в окрестности растущего тромба.

## Материалы и Методы

### Материалы

Следующие реагенты использовались в работе: Fura RED-AM. Molecular Probes (Eugene, OR, USA); бычий сывороточный альбумин (БСА) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO); фибриллярный коллаген I типа (Chrono- Log Corporation; Havertown; USA).

### Методы

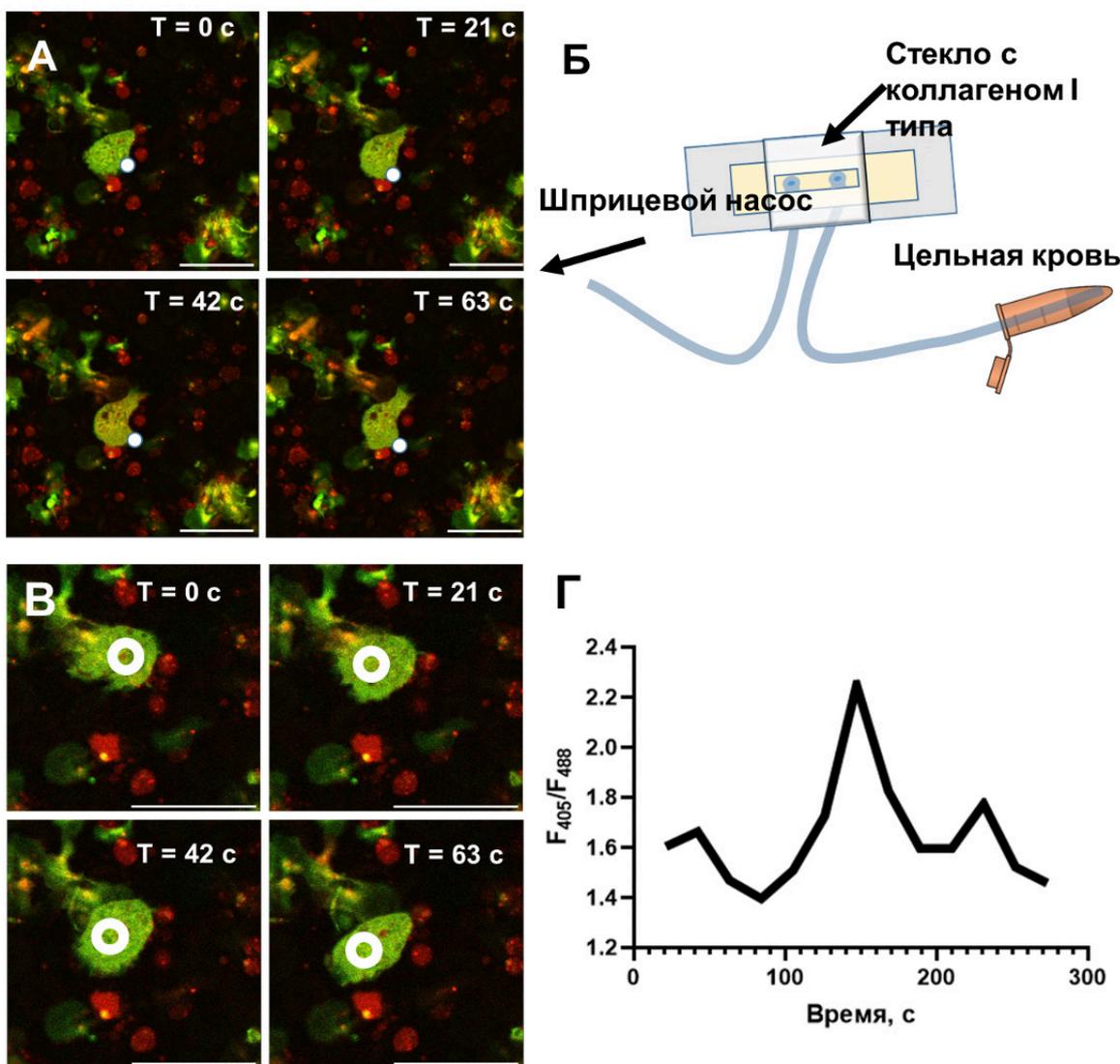
Плоско-параллельные проточные камеры собирались, как было описано ранее [23]. Параметры каналов были следующими: 0,2 x 18 x 0,20 мм. Покровные стекла покрывались фибриллярным коллагеном I типа (0,2 мг/мл) в течение 1 ч 30 мин при 37°C, промывались дистиллированной водой, блокировались 2% w/v БСА и затем вставлялись в проточные камеры (Рис. 1Б).

Кровь бралась у здоровых взрослых добровольцев (n=3, мужчины и женщины 18-35 лет) в вакуумные пробирки Sarstedt-Monovette® с гирудином (525 АТЕ/мл крови). Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией и одобрено этическим комитетом ЦТП ФХФ РАН (решение №2 от 06.04.2021 г.). От всех доноров получено письменное информированное согласие на исследование.

Для наблюдения кальциевого ответа в нейтрофилах, хемотактирующих около растущего тромба, использовался флуоресцентный маркер Fura RED. Для оценки уровня кальция в нейтрофилах использовалось соотношение  $F_{405}/F_{488}$  – отношение интенсивности флуоресценции при возбуждении лазером с длиной волны  $\lambda=405$  нм и регистрацией на длинах волн 500-550 нм (связавшейся с кальцием краски) к интенсивности флуоресценции при возбуждении  $\lambda=488$  нм и регистрацией на длинах волн 560-850 нм (не связавшейся с кальцием краски). Кровь преинкубировалась с Fura RED в концентрации 2  $\mu\text{M}$  в течение 40 минут при 37°C° и перфузировалась через плоско-параллельные проточные камеры, покрытые коллагеном, при скорости сдвига 100  $\text{c}^{-1}$ . На фибриллярном коллагене I типа наблюдались рост тромбов и адгезия нейтрофилов к растущему тромбу и подложке, а также движение нейтрофилов вокруг растущего тромба. Детали метода даны

в [10]. Ранее нами было показано, что для такой постановки наблюдаемые подвижные клетки являются исключительно нейтрофилами [10], а также что такое движение является преимущественно хемотаксисом [9]. Наблюдение кальциевого ответа в хемотактирующих нейтрофилах производилось с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti2 AX в режиме конфокальной съемки. Средняя частота съемки составляла 0.05  $\text{c}^{-1}$ .

Измерение скорости движения нейтрофилов и роста ламеллиподий производилось с помощью плагина Manual Tracking программного пакета ImageJ. Измерения проводились только для движущихся нейтрофилов. Линейную скорость роста ламеллиподии измеряли по координатам края движущейся клетки аналогично работе [24] (рис. 1А). Измерения уровня флуоресценции Fura RED производилось с помощью ImageJ вручную (рис. 1В,Г). Для каждого кадра, область измерений представляла собой круг диаметром 4  $\mu\text{m}$  в



**Рисунок 1. Методы наблюдения кальциевой сигнализации в нейтрофилах, движущихся вокруг растущего тромба.** Си(А) Типичное изображение растущей ламеллиподии нейтрофила. Белой точкой показан край растущей ламеллиподии. Шкала 20 мкм. (Б) Схема эксперимента: цельная кровь, окрашенная флуоресцентной меткой Fura RED, прокачивалась через плоско-параллельную проточную камеру в течение 30 минут. (В) Пример области, в котором измерялась флуоресценция Fura RED (белый круг). Шкала 20 мкм. (Г) Типичный вид динамики концентрации кальция ( $F_{405}/F_{488}$ ) для одиночного нейтрофила.

геометрическом центре клетки и выбиралась вручную (Рис. 1В, Видео S1).

Для исключения влияния выхода клетки из фокальной плоскости на результат измерений, вместо флуоресценции Fura RED для оценки концентрации кальция использовалось отношение флуоресценции связанной с кальцием краски к флуоресценции свободной Fura RED,  $F_{405}/F_{488}$ .

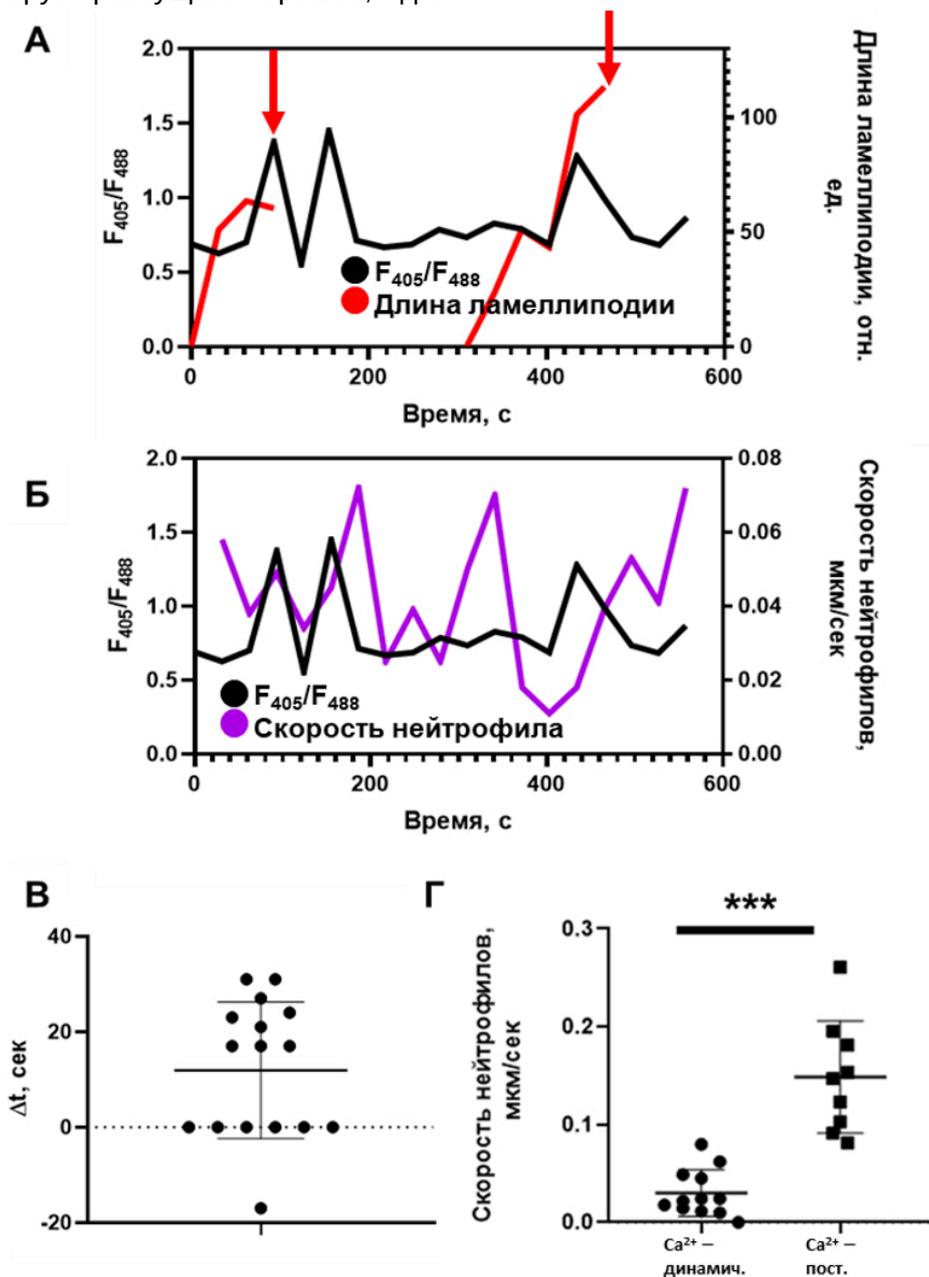
### Результаты

Нами были проанализирована кальциевая динамика в подвижных нейтрофилах человека, двигающихся вокруг растущего тромба, для

21 подвижной клетки для трех здоровых добровольцев.

Динамический кальциевый ответ в виде кальциевых осцилляций и одиночных кальциевых пиков был продемонстрирован для 12 из 21 наблюдаемых подвижных нейтрофилов. Типичный динамический ответ (Рис. 2А) представлял из себя нерегулярные кальциевые спайки.

При этом скорость движения для клеток, демонстрирующих динамический ответ, была значимо медленнее, чем для клеток, в которых концентрация кальция была постоянной (рис



**Рисунок 2. Экспериментально наблюдаемый кальциевый ответ в нейтрофилах не влияет на подвижность клеток, но регулирует ретракцию ламеллиподий.** А. Типичный кальциевый ответ в движущемся нейтрофиле. Ретракция ламеллиподий (красная стрелка) совпадает по времени с пиком концентрации кальция. На графике представлен типичный ответ из N = 16 событий ретракции ламеллиподий из 12 проанализированных клеток для 3 здоровых доноров. Б. В типичном нейтрофиле кальциевый ответ не коррелирует с подвижностью нейтрофила. На графике представлен типичный ответ из N = 12 проанализированных клеток для 3 здоровых доноров. В. Временная задержка между ретракцией ламеллиподий и ближайшим по времени кальциевым пиком. С помощью критерия Уилкоксона ( $p = 0,03$ ) показано, что временная задержка не распределена нормально со средним  $\Delta t = 0$  сек. Г. Скорости нейтрофилов, в которых уровень кальция постоянен, значительно выше, чем в клетках, в которых наблюдается динамический кальциевый ответ.

Проанализировано N = 21 клеток для 3 здоровых доноров. \*\*\* -  $p < 0,001$ . Статистическая значимость рассчитана с помощью теста Манна-Уитни.

2). Наличие двух субпопуляций скоростей нейтрофилов согласуется с данными из [25], где было показано, что хемотаксис нейтрофилов можно разделить на два этапа – медленное движение и поисковое поведение и быстрое движение после определения направления движения.

Далее нами была проанализирована связь типа кальциевого ответа в нейтрофиле с характеристиками его движения. При одновременном измерении скоростей нейтрофилов и концентрации кальция в клетках было показано, что абсолютные концентрации кальция в нейтрофиле не коррелируют со скоростью переднего края клетки для 9 из 12 проанализированных клеток с кальциевым сигналом (корреляции были проанализированы с помощью критерия Спирмана  $p > 0,05$ ). Типичный вид зависимости показан на рисунке 2Б. Аналогичные результаты были получены для корреляции событий выставления ламеллиподий с моментами кальциевых пиков (данные не показаны). Для 16 проанализированных событий, в 13 из 16 случаев, корреляции отсутствовали (корреляции были проанализированы с помощью критерия Спирмана,  $p > 0,05$ ).

При этом, для нейтрофилов, в которых наблюдалось выставление нескольких ламеллиподий и ретракция некоторых из них, пики концентрации кальция в нейтрофилах совпадали с моментом ретракции ламеллиподии, либо отличались не более, чем на один кадр видео, что, скорее всего, связано с недостаточной частотой съемки (Рис. 2Б,В). Также низкая частота съемки не позволяла оценивать пространственную динамику концентрации кальция в нейтрофиле.

С помощью критерия Уилкоксона мы проанализировали разницу между моментом ретракции ламеллиподии и ближайшим пиком концентрации кальция. В случае, если бы данные события являлись независимыми, наблюдалось бы нормальное распределение временных задержек со средней величиной задержки 0 секунд. В реальных экспериментальных данных  $\Delta t$  почти всегда была положительной величиной, и нулевая гипотеза отвергалась ( $p=0,02$ ), что указывает на то, что пик концентрации кальция и ретракция ламеллиподий связаны (Рис. 2В).

### **Обсуждение результатов**

Полученные результаты позволяют выделить два типа поведения нейтрофилов, отличающихся как динамикой кальциевых сигналов, так и скоростью миграции. Первая подгруппа клеток, демонстрировала сравнительно медленное движение и выраженные кальциевые колебания, при которых клетка, по-видимому, более интенсивно «сканирует» пространство в

поисках оптимального направления движения. В то же время, другая часть клеток, у которых концентрация кальция оставалась практически постоянной, двигалась быстрее и, вероятно, уже реализовывала «устойчивый» хемотаксис в выбранном направлении. Это согласуется с ранее описанными двумя этапами «поискового» поведения нейтрофилов [25].

При анализе связи между скоростью движения и величиной (или характером) кальциевого ответа оказалось, что прямой зависимости не прослеживается. Быстрое продвижение нейтрофилов во время хемотаксиса может сохраняться при минимальных колебаниях внутриклеточного кальция; это согласуется с точкой зрения, что в определённых условиях нейтрофилам не всегда требуется существенная активация  $Ca^{2+}$ -зависимых путей для поддержания направленной миграции [19]. Однако, судя по нашим данным, временное повышение концентрации  $Ca^{2+}$  имеет ключевое значение для локальных событий в клетке, в частности для ретракции отдельных ламеллиподий, что согласуется с данными о модулировании кальцием механизмов, ответственных за полимеризацию и деполимеризацию актина в нейтрофилах [20,21]. Известно, что в других типах клеток кальциевый сигнал также может служить триггером для ремоделирования цитоскелета: локальные выбросы  $Ca^{2+}$  активируют внутриклеточные пути, связанные с сократительной активностью актомиозина и деполимеризацией актинового каркаса, что приводит к сворачиванию (ретракции) избыточных псевдоподий [16–18].

В целом, наши данные указывают на то, что кальциевые сигналы в подвижных нейтрофилах преимущественно регулируют локальные ремоделирующие процессы (в частности, ретракцию ламеллиподий), но при этом могут не оказывать прямого влияния на общую скорость миграции клетки., а также подтверждает идею о том, что наличие или отсутствие выраженных кальциевых колебаний отражает различные стадии и способы поведения нейтрофилов при хемотаксисе.

### **Финансирование**

Работа выполнялась при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук (1022040700681-7-3.1.8).

### **Список литературы**

1. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. Neutrophil kinetics in health and disease. Trends in Immunology 2010;31:318–24. <https://doi.org/10.1016/j>

- it.2010.05.006.
2. Lu H, Um K, Tartakovsky DM. Hybrid models of chemotaxis with application to leukocyte migration. *Journal of Mathematical Biology* 2021;82:23. <https://doi.org/10.1007/s00285-021-01581-7>.
  3. Iglesias PA, Devreotes PN. Navigating through models of chemotaxis. *Current Opinion in Cell Biology* 2008;20:35–40. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.11.011>.
  4. El-Daher SS, Patel Y, Siddiqua A, Hassock S, Edmunds S, Maddison B, et al. Distinct localization and function of (1,4,5)IP(3) receptor subtypes and the (1,3,4,5)IP(4) receptor GAP1(IP4BP) in highly purified human platelet membranes. *Blood* 2000;95:3412–22.
  5. Norgauer J, Krutmann J, Dobos GJ, Traynor-Kaplan AE, Oades ZG, Schraufstatter IU. Actin polymerization, calcium-transients, and phospholipid metabolism in human neutrophils after stimulation with interleukin-8 and N-formyl peptide. *J Invest Dermatol* 1994;102:310–4. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12371788>.
  6. Schattner M, Jenne CN, Negrotto S, Ho-Tin-Noe B. Editorial: Platelets and Immune Responses During Thromboinflammation. *Front Immunol* 2020;11:1079. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01079>.
  7. Italiano Jr. JE, Battinelli EM. Selective sorting of alpha-granule proteins. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2009;7:173–6. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03387.x>.
  8. Szatmary AC, Nossal R, Parent CA, Majumdar R. Modeling neutrophil migration in dynamic chemoattractant gradients: assessing the role of exosomes during signal relay. *Molecular Biology of the Cell* 2017;28:3457–70. <https://doi.org/10.1091/mbc.e17-05-0298>.
  9. Korobkin J-JD, Deordieva EA, Tesakov IP, Adamanskaya E-IA, Boldova AE, Boldyreva AA, et al. Dissecting thrombus-directed chemotaxis and random movement in neutrophil near-thrombus motion in flow chambers. *BMC Biol* 2024;22:115. <https://doi.org/10.1186/s12915-024-01912-2>.
  10. Morozova DS, Martyanov AA, Obydennyi SI, Korobkin J-JD, Sokolov AV, Shamova EV, et al. Ex vivo observation of granulocyte activity during thrombus formation. *BMC Biol* 2022;20:32. <https://doi.org/10.1186/s12915-022-01238-x>.
  11. Krause M, Gautreau A. Steering cell migration: lamellipodium dynamics and the regulation of directional persistence. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:577–90. <https://doi.org/10.1038/nrm3861>.
  12. Ridley AJ. Rho GTPases and cell migration. *Journal of Cell Science* 2001;114:2713–22. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.15.2713>.
  13. Shin ME, He Y, Li D, Na S, Chowdhury F, Poh Y-C, et al. Spatiotemporal organization, regulation, and functions of tractions during neutrophil chemotaxis. *Blood* 2010;116:3297–310. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-12-260851>.
  14. Hann J, Bueb J-L, Tolle F, Brécharde S. Calcium signaling and regulation of neutrophil functions: Still a long way to go. *Journal of Leukocyte Biology* 2020;107:285–97. <https://doi.org/10.1002/JLB.3RU0719-241R>.
  15. Boucek MM, Snyderman R. Calcium Influx Requirement for Human Neutrophil Chemotaxis: Inhibition by Lanthanum Chloride. *Science* 1976;193:905–7. <https://doi.org/10.1126/science.948752>.
  16. Tsai F-C, Seki A, Yang HW, Hayer A, Carrasco S, Malmersjö S, et al. A polarized Ca<sup>2+</sup>, diacylglycerol and STIM1 signalling system regulates directed cell migration. *Nat Cell Biol* 2014;16:133–44. <https://doi.org/10.1038/ncb2906>.
  17. Dixit N, Simon SI. Chemokines, selectins and intracellular calcium flux: temporal and spatial cues for leukocyte arrest. *Front Immunol* 2012;3. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00188>.
  18. Khazen R, Corre B, Garcia Z, Lemaître F, Bachellier-Bassi S, d'Enfert C, et al. Spatiotemporal dynamics of calcium signals during neutrophil cluster formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2022;119:e2203855119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2203855119>.
  19. Francis EA, Heinrich V. Extension of chemotactic pseudopods by nonadherent human neutrophils does not require or cause calcium bursts. *Sci Signal* 2018;11:eaal4289. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aal4289>.
  20. Morad H, Luqman S, Tan C-H, Swann V, McNaughton PA. TRPM2 ion channels steer neutrophils towards a source of hydrogen peroxide. *Sci Rep* 2021;11:9339. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88224-5>.
  21. Yoo SK, Starnes TW, Deng Q, Huttenlocher A. Lyn is a redox sensor that mediates leukocyte wound attraction in vivo. *Nature* 2011;480:109–12. <https://doi.org/10.1038/nature10632>.
  22. Hundhammer T, Gruber M, Wittmann S. Paralytic Impact of Centrifugation on Human Neutrophils. *Biomedicines* 2022;10:2896. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10112896>.
  23. Nechipurenko DY, Receveur N, Yakimenko AO, Shepelyuk TO, Yakusheva AA, Kerimov RR, et al. Clot Contraction Drives the Translocation of Procoagulant Platelets to Thrombus Surface. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2019;39:37–47. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.311390>.
  24. Korobkin J, Garcia A, Sveshnikova A. A minimal mathematical model of neutrophil pseudopodium formation during chemotaxis. *SBPR* 2021;1:6–12. <https://doi.org/10.52455/sbpr.01.202103012>.
  25. Stopp J, Sixt M. Plan your trip before you leave: The neutrophils' search-and-run journey. *J Cell Biol* 2022;221:e202206127. <https://doi.org/10.1083/jcb.202206127>.