

- hybridization in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Cancer Sci.* 2011; 102(7): 1432—6.
16. Parrula C., Soledad A., Fernandez S.A., Landes K., Huey D., Lairmore M. et al. Success of measles virotherapy in ATL depends on type I interferon secretion and responsiveness. *Virus Res.* 2014; 189: 206—13.
17. de Waal Malefyt R., Yssel H., Spits H., de Vries J.E., Sancho J., Terhorst C. et al. Human T cell leukemia virus type I prevents cell surface expression of the T cell receptor through down-regulation of the CD3-gamma, -delta, -epsilon, and -zeta genes. *J. Immunol.* 1990; 145(7): 2297—303.
18. Kress A.K., Grassmann R., Fleckenstein B. Cell surface markers in HTLV-I pathogenesis. *Viruses.* 2011; 3(8): 1439—59.
19. Ledbetter J.A., Imboden J.B., Schieven G.L., Grosmaire L.S., Rabino-vitch P.S., Lindsten T. et al. CD28 ligation in T-cell activation: evidence for two signal transduction pathways. *Blood.* 1990; 75(7): 1531—9.
20. Mehta K., Shahid U., Malavasi F. Human CD38, a cell surface pro-tein with multiple functions. *FASEB J.* 1996; 10(12): 1408—17.
21. Tatewaki M., Yamaguchi K., Matsuoka M., Ishii T., Miyasaka M., Mori S. et al. Constitutive overexpression of the L-selectin gene in fresh leukemic cells of adult T-cell leukemia that can be transactivated by human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax. *Blood.* 1995; 86(8): 3109—17.
22. Sancho D., Gomez M., Sanchez-Madrid F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol.* 2005; 26(3): 136—40.
23. Brint E., O'Callaghan G., Houston A. Life in the Fas lane: differential outcomes of Fas signaling. *Cell Mol. Life Sci.* 2013; 70(21): 4085—99.
24. Freedman A.S., Nadler L.M. Immunologic markers in non-Hodgkin's lymphoma. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 1991; 5(5): 871—89.

Поступила 22.04.16  
Received 22.04.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.9-022-092:612.112.91

Андрюков Б.Г., Сомова Л.М., Дробот Е.И., Матосова Е.В.

## АНТИМИКРОБНЫЕ СТРАТЕГИИ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова», 690087, Владивосток, Российская Федерация

*Нейтрофильные гранулоциты традиционно рассматривали исключительно как фагоциты – клетки-убийцы вторгшихся в организм человека микроорганизмов. Открытия последнего десятилетия позволили существенно пересмотреть эту роль и значение нейтрофилов в реализации аффекторных механизмов врожденного и адапционного иммунитета. Современные достижения расширили наши представления об антимикробных стратегиях нейтрофильных гранулоцитов при инфекционной патологии: фагоцитозе, дегрануляции и формировании нейтрофильных внеклеточных ловушек. Эти стратегии также играют ключевую роль в повреждении тканей, обеспечивая цитотоксические функции. Авторы представляют современные данные о роли взаимодействия между нейтрофилами и адаптивными иммунными клетками в создании механизма деструктивной патологической активации иммунного ответа, что приводит к аутоагрессии, индукции хронического воспаления и возникновению онкологических и аутоиммунных заболеваний.*

**Ключевые слова:** нейтрофилы; фагоцитоз; дегрануляция; апоптоз; некроз; нетоз; нейтрофильные внеклеточные ловушки (НВЛ); инфекции.

**Для цитирования:** Андрюков Б.Г., Сомова Л.М., Дробот Е.И., Матосова Е.В. Антимикробные стратегии нейтрофилов при инфекционной патологии. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2016; 61 (12): 825-833. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2016-61-12-825-833>

*Andryukov B.G., Somova L.M., Drobot E.I., Matosova E.V.*

### THE ANTIMICROBIAL STRATEGIES OF NEUTROPHILS UNDER INFECTION PATHOLOGY

The G.P. Somov research institute of epidemiology and microbiology, 690087 Vladivostok, Russia

*The neutrophilic granulocytes were traditionally considered exclusively as phagocytes - killer cells of microorganisms invaded human organism. The discoveries of last decade permitted to significantly reconsider this role and importance of neutrophils in implementation of affect mechanisms of inherent and adaptive immunity. The modern achievements expanded our conceptions about anti-microbial strategies of neutrophilic granulocytes under infection pathology: phagocytosis, degranulation and development of neutrophil extracellular traps. These strategies also play a key role in damage of tissues, providing cytotoxic functions. The article presents actual data concerning the role of interaction between neutrophils and adaptive immune cells in development of mechanism of destructive pathological activation of immune response that results in an auto-aggression, induction of chronic inflammation and development of oncologic and auto-immune diseases.*

**Key words:** neutrophils; phagocytosis; degranulation; apoptosis; necrosis; netosis; neutrophil extracellular traps; infections.

**For citation:** *Andryukov B.G., Somova L.M., Drobot E.I., Matosova E.V. The antimicrobial strategies of neutrophils under infection pathology. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2016; 61 (12): 825-833. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2016-61-12-825-833>*

**For correspondence:** *Andryukov B.G., doctor of medical sciences, leading researcher. e-mail: andryukov\_bg@mail.ru*

**Conflict of interests.** *The authors declare absence of conflict of interests.*

**Financing.** *The study had no sponsor support.*

Received 30.05.2016  
Accepted 15.06.2016

Для корреспонденции: Андрюков Борис Георгиевич, д-р мед. наук, вед. науч. сотр., [andryukov\\_bg@mail.ru](mailto:andryukov_bg@mail.ru)

**Введение.** Многоклеточные организмы постоянно сталкиваются с проблемой защиты от патогенных микроорганизмов. Исторически нейтрофильные гранулоциты, составляющие от 50 до 70% популяции лейкоцитов, рассматривались в качестве клеток системы врожденного иммунитета против вторгшихся в организм человека широкого спектра микроорганизмов. Однако открытия последних десятилетий позволили существенно пересмотреть роль и значение нейтрофилов в реализации механизмов иммунной защиты организма человека [1].

Со времен работ И.И. Мечникова и П. Эрлиха нейтрофилам отводили устоявшуюся роль пассивных участников эффекторного звена иммунной системы. Однако результаты многочисленных исследований заставили пересмотреть традиционную точку зрения: установлено, что активированные нейтрофилы служат важным источником продукции и секреции иммуномодуляторных цитокинов [2]. Эти недавние открытия изменили укоренившиеся представления о роли нейтрофилов как клеток врожденного иммунитета, появилась гипотеза о центральном значении этих клеток во всей иммунной системе организма.

Кроме того, к классическому антибактериальному феномену нейтрофилов – фагоцитозу добавлены другие стратегии: дегрануляция и способность к формированию нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ, neutrophil extracellular traps, NETs), участвующих в процессах тканевого повреждения и принимающих участие в развитии хронического воспаления [3, 4].

Цель данного обзора – освещение всего спектра антибактериальных стратегий нейтрофилов при инфекционной патологии на основе использования современных научных данных.

**Антимикробные внутриклеточные компоненты нейтрофилов.** В реализации механизмов врожденного и адаптивного иммунитета важнейшую роль играют нейтрофилы (нейтрофильные гранулоциты) – наиболее многочисленный и мобильный пул лейкоцитов. Это определяет неослабевающий интерес и актуальность изучения строения и функции этих клеток крови.

Свое название они получили вследствие наличия в цитоплазме гранул, компоненты которых играют основную роль в эффекторных функциях нейтрофилов. Гранулы разделяют на четыре типа: первичные (азурофильные), появляющиеся в процессе дифференцировки на стадии промиелоцита; вторичные (специфические), возникающие на стадии превращения в миелоциты; третичные, или желатиновые гранулы [8] и секреторные (везикулы), появляющиеся в зрелых сегментированных формах [9]. Все типы гранул различаются составом и обеспечивают антимикробную функцию нейтрофилов.

Зрелые первичные гранулы в основном содержат миелопероксидазу (МПО, специфический маркер, преобразующий перекись водорода в хлорноватистую кислоту, которая обладает мощной антимикробной активностью, и являющийся аутокринным регулятором активации нейтрофилов), а также эластазы, катепсин G, кислую фосфатазу и другие ферменты группы кислых гидролаз, лизоцим и катионные антимикробные белки, представленные у человека нейтрофильными пептидами:  $\alpha$ -дефензинами и сериновыми протеазами, нарушающими функции или структуру микробов [10–12].

В конце XX века хорошо охарактеризован ряд пептидных компонентов первичных гранул нейтрофилов человека. Один из них, бактерицидный белок, повышающий проницаемость (bactericidal/permeability-increasing protein, BPI), представляет собой катионный белок, м. м. 55 кДа, имеющий большое клиническое и патогенетическое значение [10]. Обладая высоким родством к липиду A (основному компоненту липидной части большинства вариантов эндотоксина), этот белок влияет на жизнеспособность грамотрицательных бактерий по механизму повышения проницаемости их внешней мембраны путем деградации пептидогликанов и фосфолипидов [13]. Избирательная активность BPI определяется взаимо-

действием его с эндотоксином – компонентом внешней мембраны и основным молекулярным паттерном (PAMP) грамотрицательных бактерий, служащим мощным индуктором врожденного иммунного ответа и воспаления в организме человека [14]. Антибактериальная активность BPI подтверждена при заболеваниях, ассоциированных с *Salmonella* и *Yersinia* [15], *E. coli* [16], возбудителями респираторных инфекций [17], атеросклерозе [18], обструктивной болезни легких [19], а также при экспериментальных исследованиях влияния липополисахарида (ЛПС) грамотрицательных бактерий на эффективность миелоаблативной терапии пациентам с миело- и лимфопрлиферативными заболеваниями крови после аллогенной трансплантации клеток [14].

Гранулярные противомикробные пептиды нейтрофилов (и в том числе, BPI), служат мощным инструментом, нейтрализующим активность эндотоксина (ЛПС) грамотрицательных бактерий [2]. При инфицировании организма и попадании эндотоксинов в кровь они извлекаются из бактериальных мембран или после разрушения распознаются ЛПС-связывающим протеином (Lipopolysaccharide binding protein, LBP), циркулирующим в сыворотке крови и относящимся к острофазовым белкам. Образовавшийся белково-рецепторный комплекс LBP-ЛПС связывается с провоспалительными рецепторными комплексами, расположенными на поверхности нейтрофилов, содержащих Toll-like рецептор 4 (TLR4), кластер дифференцировки 14 (CD14) и миелоидный фактор дифференцировки 2 (MD-2). Затем при участии внутриклеточного TIR-домена сигнального рецептора и цитозольного адаптерного белка MyD88 происходит инициация дальнейшего иммунного ответа организма [11, 14].

Результаты этих исследований стали основой для разработки одной из биологических компаний (ХОМА Ltd, США) препаратов на основе рекомбинантных N-концевых фрагментов BPI, обладающих мощной ЛПС-нейтрализующей активностью [13].

Вторичные, или специфические гранулы содержат в основном антибактериальные компоненты, такие как лактоферрин (специфический маркер), лизоцим, ряд белков и ферментов [20]. Основным ферментом третичных гранул стала желатиназа (специфический маркер). Она служит резервом матрикс-деградирующих ферментов и мембранных рецепторов, необходимых для экстравазации и диапедеза нейтрофилов. Наконец, секреторные гранулы (пузырьки), являющиеся эндосомами, содержат металлопротеиназы и щелочную фосфатазу (специфический маркер), а также ряд белков. Они оказываются наиболее мобильными гранулами зрелого нейтрофила и представляют собой пул рецепторов, включаемых в плазматическую мембрану, после слияния секреторных пузырьков с мембраной нейтрофила [9, 20].

Таким образом, в своих антимикробных стратегиях нейтрофилы могут использовать до 300 ферментных и белковых компонентов гранул, обладающих высокой реакционной способностью, широкой субстратной специфичностью и антибактериальной активностью. Эти компоненты могут быть секретированы во внеклеточное пространство или оставаться связанными с мембраной нейтрофилов, будучи одинаково токсичными как для микроорганизмов, так и для клеток организма-хозяина.

**Гомеостаз нейтрофилов.** Нейтрофилы имеют короткую продолжительность жизни (от нескольких часов до нескольких дней), и их численный гомеостаз поддерживается непрерывным высвобождением зрелых клеток в периферический кровоток их костного мозга, где их содержится около 60% общего числа клеток [3, 12]. Для поддержания гомеостаза популяции нейтрофилов скорость их созревания и продукции в костном мозге человека составляет  $1-2 \cdot 10^{11}/л$  в сутки. Пролиферация, созревание и терминальная дифференцировка гра-

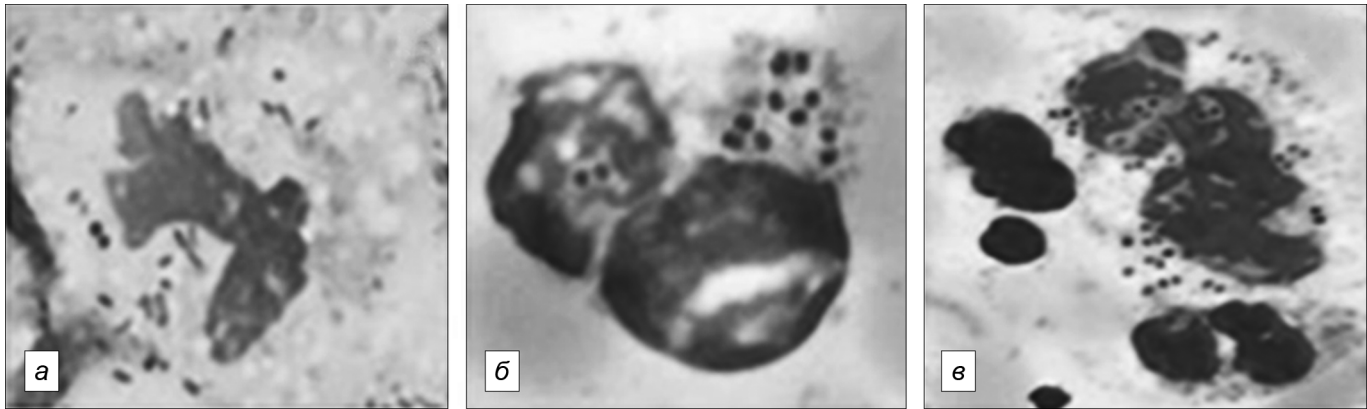


Рис. 1. Поглощение нейтрофилами микроорганизмов (фагоцитоз) с последующим их разрушением и выделением из организма. *а* – стадия активации клетки, *б* – хемотаксис к микроорганизму, *в* – рецепторное распознавание и адгезия к поверхности патогена. Окраска по Романовскому–Гимзе. Ув.  $\times 1800$ ; камера Levenhuk C-Series (фото – авторов).

нулоцитарных нейтрофилов – сложные и строго регулируемые процессы, которые контролируются регуляторами транскрипции, факторами роста, интерлейкинами, микроРНК [3, 8, 12], колониестимулирующими факторами и другими системами кроветворения, под действием которых незрелые клетки-предшественники превращаются в зрелые нейтрофилы [12, 18]. Количество нейтрофилов в периферических тканях влияет на скорость производства зрелых клеток в костном мозге посредством отрицательной обратной связи [18].

Появление тяжелых инфекций у пациентов с нейтропенией или с иммунодефицитами служит иллюстрацией и доказательством важности антимикробной функции нейтрофилов [11]. У пациентов с такой патологией нередко возникают тяжелые инфекции, вызванные условно-патогенными бактериями [21].

При отсутствии очага инфекции неактивные нейтрофилы в основном находятся в состоянии покоя, циркулируя в крови и составляя большую часть лейкоцитарной фракции. При этом длительность жизни циркулирующих нейтрофилов в крови составляет несколько часов. При появлении воспалительного сигнала от микробных молекул и цитокинов (таких как интерлейкины, интерфероны, факторы некроза опухоли) – продуктов взаимодействующих клеток-продуцентов – нейтрофилы активируются и быстро, в массовом количестве покидают кровяной барьер, преодолевая барьер из эндотелиальных клеток сосудов, и колонизируют очаг инфекции [12, 18]. В обзорах Y. Kobayashi, E. Harris. и T. Mayadas и соавт. (2014) подробно описаны многоступенчатые молекулярные механизмы активации и диапедеза нейтрофилов – нейтрофильной пара- и трансэндотелиальной миграции [1, 22, 23].

Механизмы активации нейтрофилов, будучи первым и важным этапом антимикробной защиты организма, в то же время могут служить патофизиологическим звеном формирования аутоиммунных и хронических воспалительных заболеваний [1, 9].

Таким образом, нейтрофилы – первые эффекторные клетки, в огромном количестве колонизирующие очаг инфекции. Они, активно взаимодействуя с другими иммунокомпетентными клетками, активируются и реализуют свои антибактериальные стратегии – фагоцитоз, дегрануляцию и формирование НВЛ [9].

**Фагоцитоз.** В течение многих десятилетий фагоцитоз считали основной антимикробной стратегией нейтрофилов при инфекционной патологии. В процессе развития инфекции нейтрофилы выполняют свою основную функцию – поглощение микроорганизмов, собственных поврежденных

клеток и продуктов их распада, элиминируют их, используя кислород-зависимые и кислород-независимые механизмы [8, 12].

История открытия фагоцитоза нейтрофилов в 1882 г. связана с именем русского микробиолога И.И. Мечникова, который за это открытие совместно с П. Эрлихом получил Нобелевскую премию в области медицины (1908). Открытие ученого стало основой формирования иммунологии как науки. Дальнейшие исследования фагоцитоза показали, что, кроме нейтрофилов, способностью к фагоцитозу обладают моноциты (тканевые макрофаги) [цит. по 10].

Фагоцитоз – это процесс поглощения нейтрофилами микроорганизмов с последующим их разрушением и выделением из организма, механизм которого состоит из нескольких стадий: активации клетки, хемотаксис к микроорганизму, рецепторное распознавание и адгезия к поверхности патогена (рис. 1).

Распознавание нейтрофилами микроорганизмов – пусковой момент фагоцитоза. Оно основано на детекции их с помощью классов поверхностных и внутриклеточных рецепторов. Наиболее значимыми рецепторами человека служат Toll-подобные рецепторы (Toll-like receptors, TLR1, TLR2, TLR3 ... TLR10), имеющие значительное родство в структуре и механизме действия. Каждый из TLRs связывается для распознавания со своим высоко консервативным микробным лигандом (химической структурой), специфическим для больших групп микроорганизмов – PAMP (pathogen-associated molecular patterns) [10, 22], а также с многочисленными эндогенными лигандами, образующимися при повреждении собственных тканей организма (фибриноген, белки теплового шока и др.). Например, для TLR1 такими лигандами служат липопептиды, а для TLR2 – пептидогликаны грамположительных и грамотрицательных бактерий, TLR4 – эндотоксин грамотрицательных бактерий и т. д. [10, 18].

Связывание TLRs со специфическими лигандами приводит к активации нейтрофилов, замедляет их апоптоз и индуцирует секрецию цитокинов. Мощным усилителем активности является опсонизация патогенов с участием классических опсонов IgG и C3b и нейтрофильных рецепторов Fc $\gamma$ Rs и лектинов С-типа (маннозные рецепторы, лектины, скавенджер-рецепторы), в отсутствии которых фагоцитоз оказывается неэффективным. С другой стороны, чрезмерное тканевое накопление служит толчком для возникновения аутоиммунной патологии, опосредованной повреждением собственных тканей организма [12].

Таким образом, процесс, связанный с уничтожением ней-



трофилами вторгшихся патогенов, зависит от трех основных механизмов: 1) рецептор-ассоциированное поглощение возбудителя с образованием вакуоли; 2) производство в вакуолях высокотоксичных АФК; 3) слияние вакуолей с нейтрофильными гранулами, содержащими различные антимикробные компоненты, с образованием фагосомы.

В дальнейшем происходит образование фаголизосомы путем сливания фагосомы и содержимого гранул нейтрофила (внутриклеточная дегрануляция), а также последующее переваривание микроорганизмов с помощью антимикробных пептидов, ферментов и высоких концентраций АФК [24]. Р. Nordenfelt и соавт. (2011) показали, что процесс поглощения опсонизированных частиц при нейтрофильном фагоцитозе происходит менее чем за 20 с [25], а слияние фагосом с гранулами проходит в определенной последовательности (сначала – специфические, а затем – азурофильные), что обеспечивает максимальную эффективность переваривания [10, 25, 26].

При взаимодействии нейтрофилов с патогенными или условно-патогенными микроорганизмами разрушение объекта фагоцитоза – внутриклеточное «переваривание» – реализуется в результате активации двух сложных механизмов внутриклеточного киллинга: кислород-зависимого, при котором происходит увеличение потребления глюкозы и кислорода (респираторный взрыв) и кислород-независимого, при котором находящиеся внутри фаголизосомы бактерии погибают под действием содержимого гранул [8, 12].

Кислород-зависимая цитотоксичность фагоцитов играет ведущую роль в деструкции опсонизированного объекта фагоцитоза. Цитотоксичность данного механизма сопряжена со значительным повышением интенсивности метаболизма с участием кислорода, который используется в окислении кофермента никотинамиддинуклеотидфосфата (НАДФН) с образованием супероксид-аниона [17, 27]. Под действием супероксиддисмутазы происходит превращение супероксид-аниона в токсичные активные формы кислорода (АФК) при каталитическом участии миелопероксидазы. При кислород-зависимом киллинге потребление кислорода нейтрофилом может увеличиться во много раз в течение нескольких секунд [25, 27].

Таким образом, нейтрофилы фагоцитируют микробы и впоследствии убивают их путем продукции АФК в агрессивной среде фаголизосомы. Сочетание антибактериального действия содержимого гранул и АФК ведет к киллингу микроорганизмов, и, возможно, эти механизмы работают согласованно, потенцируя друг друга. АФК в равной степени токсичны как для объектов фагоцитоза, так и для нейтрофилов, поэтому последние вырабатывают систему защиты, заключающуюся в дисмутации супероксид-аниона в перекись водорода и ее конверсию в воду под действием каталазы [17, 27].

Кислород-независимые механизмы активируются в результате контакта опсонизированного объекта с мембраной фагоцита. В процессе фагосомо-лизосомального слияния первыми с мембраной фагосомы сливаются гранулы, содержащие лактоферрин и лизоцим, затем к ним присоединяются азурофильные гранулы, содержащие катионные белки, протеиназы (например, эластаза и коллагеназа), катепсин G, дефензины и др. Эти химические соединения вызывают повреждение клеточных мембран, нарушение некоторых метаболических процессов и переваривание убитых бактерий [27].

Долгое время считали, что фагоцитозом ограничивается основная функция иммунологической защиты нейтрофилов, а сами клетки рассматривали в качестве неспецифических эффекторов врожденного иммунитета, погибающих после выполнения своей роли, используя одну из форм запрограммированной гибели клеток (ПГК) – апоптоз или некроз [16]. На рубеже XX и XXI веков Kobayashi S. (2003) обнаружил, что респираторный взрыв, будучи следствием активации нейтро-

филов, меняет экспрессию ряда генов, в результате чего после фагоцитоза гранулоцит подвергается апоптозу [28].

Другая форма запрограммированной гибели нейтрофилов, возникающая после фагоцитоза – некроз, связана с действием факторов патогенности бактерий, вызывающих повреждение и некроз нейтрофилов, при которой нарушается целостность внешней мембраны и теряется сегментация ядра [23, 28].

*Дегрануляция нейтрофилов.* Важнейшим критерием функциональной активации клеток врожденного иммунитета при инфекционном воспалении, служит дегрануляция (экзоцитоз) нейтрофилов с регулируемым и последовательным высвобождением арсенала содержимого гранул в цитоплазму и во внеклеточное пространство. Этот процесс регулируется структурными изменениями актинового цитоскелета клетки и сигналами рецепторного аппарата на внешнюю стимуляцию [11, 29].

С этой антимикробной стратегией нейтрофилов, которая оказывается прогностическим показателем риска генерализации воспалительного процесса [19], связывается триггерная роль в связи с появлением дегенеративных сосудистых и тканевых изменений, ассоциированных с инфекционным процессом [23, 27].

Основной механизмом секреторной дегрануляции нейтрофилов – последовательное и строго регулируемое высвобождение содержимого гранул в клеточную цитоплазму и во внеклеточное пространство. При этом высвобождается широкий спектр протеолитических ферментов и антибактериальных пептидов, обладающих цитотоксическим действием. Процесс регулируется структурными изменениями актинового цитоскелета после сигнальной стимуляции рецепторным аппаратом клетки [18].

При рассмотрении механизмов фагоцитоза отмечено активное участие содержимого гранул, секрета которого активно происходит в процессе фагосомно-лизосомального слияния. Выделение дегрануляции в качестве отдельной антибактериальной стратегии произошло вследствие появления многочисленных данных об автономности экзоцитоза (рис. 2).

Обнаружение и количественное определение в плазме крови гранулярных энзимов и антимикробных пептидов используют в клинических и научных исследованиях при различных физиологических и патологических процессах. Их рассматривают в качестве основных гуморальных факторов врожденного иммунитета (лизоцим), которые служат маркерами синдрома эндогенной интоксикации (среднемолекулярные пептиды) и активности воспалительного процесса (лактоферрин), скрининга специфических антител при аутоиммунных заболеваниях для выявления соответствующих антигенов гранулоцитов и оценки состояния гомеостаза [3, 19]. Клиническое значение определения этих ферментов и пептидов связывают с их участием в координации иммунного ответа и внеклеточном управлении инфекционным воспалением [21, 30].

Кроме того, в качестве маркера активности дегрануляции нейтрофилов используют ряд количественных показателей: повышение экстрацеллюлярной активности эластазы [31], снижение внутриклеточного содержания первичных гранул, содержащих эластазу и сериновые протеазы [32], увеличение содержания в плазме крови комплекса эластаза- $\alpha$ -1-ингибитор [33, 34].

С появлением феномена дегрануляции нейтрофилов связывают формирование более напряженного иммунитета [8, 21, 35], а количественные маркеры интенсивности дегрануляции можно рассматривать в качестве показателей иммунной активности бактериальных вакцин [36].

Дегрануляция нейтрофилов запускается при их активации молекулярными паттернами грамотрицательных бактерий (липополисахаридами, ЛПС) [37] и сопровождается

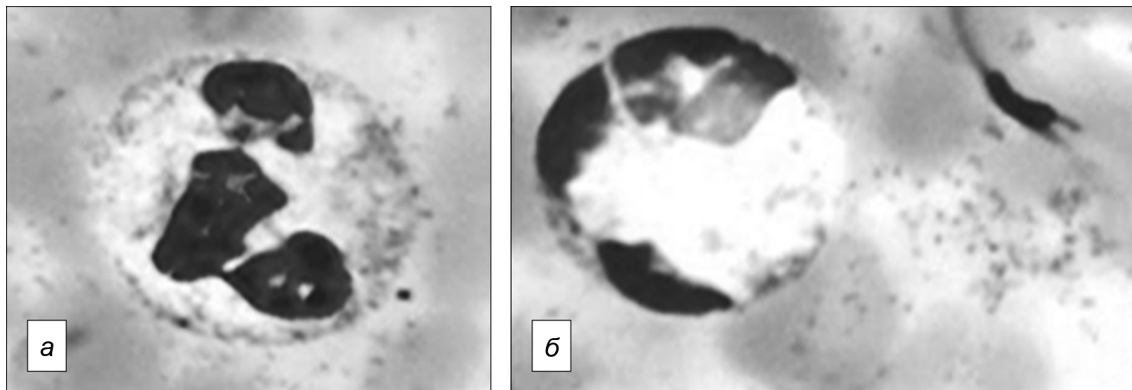


Рис. 2. Эффект дегрануляции нейтрофилов после активации грамотрицательными бактериями (*Yersinia pseudotuberculosis*, штамм 2517).

*а* – увеличение размеров, поляризация, смещение гранул к головному концу и их слияние с плазмолеммой; *б* – выброс содержимого гранул из клетки. Окраска по Романовскому–Гимзе. Ув. х 1800; камера Levenghuk C-Series (фото – авторов).

секрецией провоспалительных цитокинов [23, 38] при киллинге опсонизированных микроорганизмов [11, 24, 39] или взаимодействии с белками внеклеточного матрикса, такими как фибронектин, коллаген и ламинин [40].

В недавнем исследовании I. Naegelen и соавт. [41] изучали динамику секреции активированными нейтрофилами цитокинов и эффекта дегрануляции гранулоцитов. Выявлено, что секреция цитотоксических белков, содержащихся в гранулах, и цитокинов активированными нейтрофилами, обнаруженными в очагах инфекции, имеет выраженные кумулятивный и синергический эффекты, влияющие на формирование тканевого воспаления в окружающих тканях. Это подтверждает результаты, полученные O. Soehnlein и соавт. и K. Malcolm и соавт. [42, 43].

Исследования, выполненные в последние годы, показали, что первичная реакция в очаге воспаления – первый шаг афферентного участка нейтрофилов в модуляции иммунных реакций – врожденной иммунной системы и приобретенного адаптивного иммунитета. Характер инфекционного процесса зависит от течения иммунных реакций и эффективности антибактериальных систем клеток врожденного иммунитета, в том числе нейтрофилов, функционирующих не только в качестве фагоцитов. Они непосредственно взаимодействуют с лимфоцитами [19, 44], естественными клетками-киллерами [10], макрофагами [12] и дендритными клетками [12, 45], играющими центральную роль в реализации реакций адаптивного иммунитета. Это взаимодействие опосредуется способностью нейтрофилов секретировать ряд цитокинов, которые непосредственно взаимодействуют с другими иммунокомпетентными клетками [19, 46].

**Нейтрофильные внеклеточные ловушки.** В начале XXI века V. Brinkmann и соавт. (2004) описали новую стратегию антимикробного действия нейтрофилов – формирование во внеклеточном пространстве сетеподобных структур (нейтрофильных внеклеточных ловушек, НВЛ или NETs – neutrophil extracellular traps). После более чем десятилетнего активного изучения нового феномена стратегия НВЛ прочно утвердилась в качестве одного из основных биологических механизмов, используемых нейтрофилами при инфекционной патологии [47]. Результаты многочисленных научных исследований и наблюдений подтвердили и расширили первоначальные суждения о роли нейтрофильных сетей в патогенезе бактериальных, вирусных, протозойных и грибковых инфекций [48].

Запуск формирования НВЛ может быть обусловлен различ-

ными сигналами, включая молекулярные детерминанты микроорганизмов [45, 48], фармакологические средства [46], воспалительные цитокины [47], фактор некроза опухоли альфа, ФНО- $\alpha$  [48, 49], активированные эндотелиальные клетки, факторы гранулоцитарного роста, иммунные комплексы [49] и др.

НВЛ содержат лентовидные волокна (около 17 нм в диаметре), продуцируемые активированными нейтрофилами, в состав которых входят ДНК, положительно заряженные гистоновые белки (обладающие в 100 раз большей бактерицидной активностью, чем дефенсины), а также различные ферменты и протеины – всего более чем 30 компонентов [47, 48]. Немаловажное биологическое свойство гистоновых белков вызывать активацию тромбоцитов и образование тромбина лежит в основе прокоагулянтного действия НВЛ [48].

Некоторое время цель образования сетей-ловушек была не вполне ясна, однако вскоре, после того как подобное свойство было обнаружено также у тучных клеток и эозинофилов, стало ясно, что эти крупные внеклеточные структуры обеспечивают физический барьер для микробного распространения, изолируют и уничтожают микробные патогены, предотвращая дальнейшую колонизацию макроорганизма [47, 49, 50].

Кроме того, активное изучение этого феномена позволило выявить еще одну важную функцию, связанную с индукцией ловушками сигнала опасности, связанного с обнаружением бактериальных молекулярных структур (damage-associated molecular pattern, DAMPs), лежащего в основе взаимодействия врожденного и адаптивного иммунитета, а также играющего существенную роль в патогенезе ДВС-синдрома, связанного с высокой прокоагулянтной активностью НВЛ [48, 50, 51].

Новая антибактериальная стратегия нейтрофилов получила название «нетоз» (NETosis) [48, 50]. Последующие исследования показали, что образование ловушек – генетически контролируемый процесс [47, 51], а в некоторых случаях они могут формироваться в качестве альтернативы фагоцитозу, например при паразитарных инфекциях, когда поглощаемый объект слишком велик. Дальнейшие исследования показали, что и другие клетки крови (эозинофилы, тучные клетки, моноциты) при активации также способны формировать NETs, что дало основание переименовать данную стратегию в ETosis [52]. Таким образом, образование внеклеточных ловушек служит еще одной антимикробной стратегией нейтрофилов и важным механизмом врожденного иммунного ответа, а нетоз (NETosis) – еще одной формой програм-

**Механизмы формирования нейтрофильных внеклеточных ловушек**

Время	Этап	Стадия	
		морфологических изменений	биохимических изменений
Начало	Активация нейтрофила	Деконденсация хроматина и высвобождение ДНК; десегментация ядра; расширение пространства между ядерными мембранами [48]	Этап I. Генерация АФК через активацию ферментного комплекса NADPH-оксидазы; активируются протеинкиназа С и процессы дыхательного взрыва; возникают АФК; запускается реакция цитруллинизации гистонов; индуцируется клеточная сигнальная система [47, 51]
1 ч	Деструкция ядра	Из ядерной оболочки начинают формироваться отдельные пузырьки; нуклеолема распадается на множество мелких пузырьков; происходит высвобождение хроматина в цитоплазму [49, 53]	Этап II. Активация пептидил аргинин доминазы, протеазы и антимикробных пептидов, содержащихся в гранулах; конвертация ДНК в активную форму с последующей стимуляцией плазмодитоидных дендритных клеток и высвобождением цитокинов [49, 54]
2 ч			
3 ч	Активация цитоскелета	Структура цитоплазматических гранул изменяется; увеличение пространства между внутренним и внешними мембранами, разрушаются мембраны; содержимое гранул растворяется в цитоплазме; большая часть гранул исчезает. Сокращение нейтрофила пока не разорвется внешняя мембрана.	Этап III. Из первичных гранул в цитоплазму выходят миелопероксидаза, катепсин G и эластаза; из вторичных (специфических) гранул – лактоферрин; из третичных гранул – желатиназа [49, 52, 54]
Конец	Формирование НВЛ, нетоз	Высокоактивная смесь попадает во внеклеточное пространство, формируя объемную сеть, в которую попадают микроорганизмы. Происходит гибель нейтрофила	Этап IV. Нити ДНК сетей обеспечивают основу для адгезии и последующей контактной активации калликреин-кининовой системы и факторов свертывания крови – происходит стимуляция процессов гемокоагуляции [54]

мированной гибели нейтрофилов, альтернативой апоптозу и некрозу, описанным в 60-х годах XX века [47, 48, 50, 52].

Апоптоз, будучи одним из основных типов запрограммированной гибели клеток, хорошо охарактеризован в последние десятилетия XX века, когда описаны два его независимых механизма активации – внешний (каспазозависимый) и внутренний (митохондриальный) [27]. Индукция указанных механизмов запускает активацию каскада основных ферментов апоптоза – каспаз и в итоге приводит к характерным морфологическим и биохимическим признакам апоптоза, таких как презентация фосфатидилсерина на внешнюю поверхность клеточной мембраны, ядерная конденсация, блеббинг мембраны и фрагментация геномной ДНК [22, 25, 39].

Основными морфологическими отличиями нетоза от апоптоза служат разрушение ядерной мембраны, деконденсация хроматина, отсутствие фрагментации ДНК, смешивание содержимого ядра и цитоплазмы и высвобождение их во внеклеточное пространство [49, 50]. Биохимическими отличиями нетоза от апоптоза считаются независимость от активности каспаз, индукция АФК и активация трансмембранного мультисубъединичного комплекса НАДФН-оксидазы [17, 27, 51].

Морфологическое сходство нетоза и некроза проявляется в разрушении клеточных мембран. Однако изменение ядра при нетозе в виде потери характерной дольчатой структуры, предшествующее формированию сетей становится отличием этой формы ПГК от некроза (некроптоза), который традиционно считается основной формой ПГК, вызванной воспалением. Некроз морфологически характеризуется набуханием органелл, увеличением объема клеток, разрушением плазматической мембраны, однако при некрозе ядерная мембрана остается неповрежденной, а ДНК – в пределах ядерной оболочки [50, 52].

Исследования, проведенные L. Sun и соавт. (2012) и P. Vandenabeele и соавт. (2010) с использованием генетических подходов показали существование нескольких путей в регуляции некроза, связанных с субклеточными механизмами, в том числе индукцией генерации АФК и гиперполяризацией митохондриальной мембраны [53, 54].

Масс-спектрометрический анализ позволил выявить до 24 нейтрофильных белков и ферментов, связанных с образованием ловушек [48, 51]. Результаты последующих многочисленных исследований позволили установить механизмы формирования НВЛ (см. таблицу).

Таким образом, в результате проведенных исследований предложены две модели формирования НВЛ (рис. 3). Первая модель NETosis рассматривается как одна из форм ПКГ, связанная с нарушением целостности плазматической мембраны и высвобождением деконденсированного хроматина и содержимого гранул во внеклеточное пространство [53, 54]. Эта модель NETosis, ассоциированная с клеточной смертью, является зависимой от НАДФН-оксидазы и характеризуется изменением морфологии ядра, которое теряет свое специфическое дольчатое строение [17, 27].

Впоследствии ядерная мембрана фрагментируется и деконденсированный хроматин вместе с гистонными белками секретируется в цитоплазму, а плазматическая мембрана остается неповрежденной. Наконец, происходит сокращение нитей цитоскелета, цитоплазматическая мембрана теряет свою целостность, и сформированная масса биологически активных веществ в виде молекулярного облака освобождается во внеклеточное пространство [53]. Механизм формирования сети занимает 120–240 мин [54].

Второй, альтернативный механизм NETosis представлен как формирование сети из митохондриальной ДНК интактных нейтрофилов, которые выпускают пузырьки, содержащие деконденсированный хроматин и гранулярные гистоновые белки в межклеточное пространство, где они собираются в сети. В отличие от первого, суицидального (позднего) варианта, альтернативный (ранний) механизм зависит от индукции АФК, протекает быстро (в течение 5–60 мин) и не связан с гибелью клеток, но ассоциирован с аутофагией [50, 52]. Естественно, НВЛ, полученная из митохондриальной ДНК, имеет другую структуру по сравнению с сетями, полученными из ядерной ДНК. Исследования Yousefi и соавт. (2009) показали, что альтернативные ловушки содержали гистоновые белки и ферменты гранул нейтрофилов с митохондриальной ДНК, но в них отсутствовали ядерные протеины [55].

Принципиальным моментом обоих механизмов формирования сетей-ловушек служит необходимость прикрепления нейтрофила к тканевым структурам под контролем одного из рецепторов адгезии (например, CD18, LFA-1 и Mac-1), что объясняет отсутствие фактов образования НВЛ в цельной крови, несмотря на периодическое повышение концентрации активаторов в сыворотке [51, 54, 55].

Однако независимо от модели образования НВЛ представ-



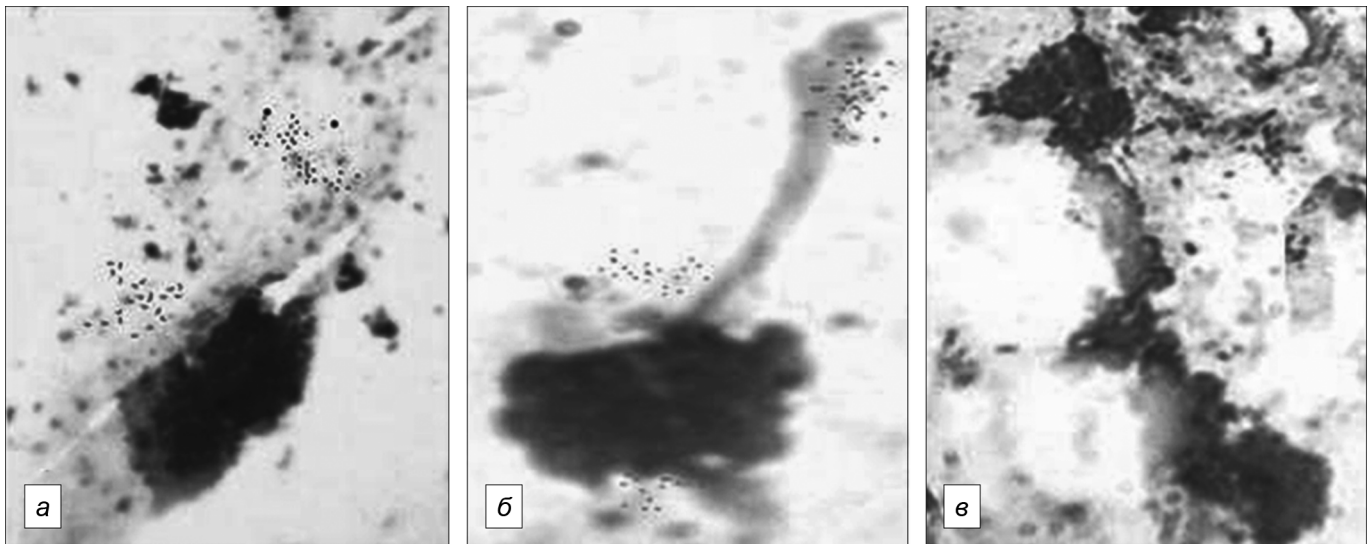


Рис. 3. Формирование нейтрофильных внеклеточных ловушек.

*a* – десементация ядра, разрыв клетки, выход высокоактивной смеси из ДНК, гистоновых белков и волокон во внеклеточное пространство, *б, в* – формирование объемной сети, в которую попадают микроорганизмы.

Окраска по Романовскому–Гимзе. Ув. х 1800; камера Levenhuk C-Series (фото – авторов).

ляют собой крупные внеклеточные структуры, обладающие электростатическим зарядом [53] и высоко локализованной бактериальной активностью. Они способны обеспечивать физиологический барьер, предотвращать распространение микроорганизмов и увеличивать интратканевую локализацию антимикробных субстанций, что в итоге инактивирует факторы патогенности бактерий [43, 55]. Попавшие в сети микроорганизмы теряют подвижность и в дальнейшем элиминируются макрофагами.

Очевидно, что в естественных условиях в организме человека роль НВЛ заключается в борьбе с патогенными микроорганизмами. В исследованиях Neeli и соавт. (2008) показано, что ловушки были более эффективны в отношении грамотрицательных микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* [56]. Впоследствии показан антибактериальный эффект НВЛ и в отношении грамположительной флоры, внутриклеточных микроорганизмов, грибов и простейших, которые во много раз крупнее нейтрофилов [39, 49, 52, 53].

Интересно отметить, что в процессе эволюции микроорганизмы выработали разнообразные стратегии для уклонения от механизмов иммунной защиты, в том числе от сетеподобных структур нейтрофилов. Например, молекулярно-биохимические модификации поверхностных структур, способные ослабить или нейтрализовать бактерицидные механизмы НВЛ [52, 55, 56]. Некоторые виды стрептококков (пневмококки) выделяют нуклеазы типа ДНКаз, которые способны вызывать деградацию сетей *in vitro* [44]. Другие виды микроорганизмов способны ингибировать формирование АФК [49].

Дальнейшая судьба НВЛ – предмет многочисленных исследований последних лет. С. Farrera и V.Fadeel (2013) и S. Sangaletti и соавт. (2012) показано, что сети, находящиеся отдельно от нейтрофилов, подвергаются последующему фагоцитозу дендритными клетками [57] и макрофагами (моноцитами) в тканях или деградации с помощью ДНКаз [58].

Изучение феномена образования НВЛ и нетоза, а также их связи с патогенезом неинфекционной патологии – одно из самых интересных и актуальных направлений современных научных исследований. Несмотря на доказанную антибактериальную эффективность нейтрофильных ловушек, в последние годы растет количество исследований, указыва-

ющих на их активное участие в патофизиологических процессах в организме, связанных с индукцией аутоиммунных и хронических воспалительных процессов, онкологических заболеваний.

Две группы ученых Y. Wang и соавт. и M. Leshner и соавт. провели перспективные исследования, связанные с изучением роли активности фермента пептидил-аргинин деиминазы 4 (peptidylarginine deiminase 4, PAD4) в индукции формирования нейтрофильных ловушек, а также в одновременном ингибировании генов-супрессоров злокачественных опухолей молочной железы, легких и костей [59, 60]. В этой связи авторы рассматривают потенциальную возможность ингибирования избыточной активности PAD4 в качестве механизма противоопухолевой защиты организма [59].

Избыточная локальная концентрация медиаторов воспаления при нетозе может вызывать аутоиммунные реакции и асептическое воспаление, сопровождающиеся повреждением окружающих тканей [49, 52, 60]. Гипотеза аутоактивности НВЛ лежит в основе связи нетоза с патогенезом системной красной волчанки [59, 60], васкулитов [60], воспалительных заболеваний кишечника [47], атеросклероза [51], антифосфолипидного синдрома [52, 53] и обусловленных ими рисков артериальных и венозных тромбозов, а также подагры, псориаза, сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний [44, 53].

Суммируя многочисленные доказательства причастности нетоза к патогенезу аутоиммунных заболеваний и асептического воспаления, авторы рассматривают как минимум два возможных механизма: один из них предполагает участие НВЛ в цитотоксическом повреждении органов и появлении аутоантигенов, второй – в триггерной роли компонентов сетей, запускающих аутоиммунные реакции [56].

**Заключение.** Таким образом, нейтрофильные гранулоциты, будучи клетками врожденной иммунной системы, используют различные стратегии антимикробной защиты организма в процессе развития инфекционного воспаления. В зависимости от природы сигнала активации и стоящих перед ними эффекторных задач, нейтрофилы используют различные стратегии антибактериальной защиты: фагоцитоз, дегрануляция и формирование внеклеточных сетей-ловушек,

являясь активным афферентным участником модуляции иммунных реакций – врожденной иммунной системы и приобретенного адаптивного иммунитета.

Однако, кроме очевидной полезности нейтрофильных антибактериальных стратегий, результаты исследований, проведенных в последнее десятилетие, раскрыли ряд деструктивных патогенетических механизмов, индуцирующих формирование воспалительных, аутоиммунных и онкологических заболеваний, ассоциированных с цитотоксической функцией нейтрофилов. Знания этих механизмов легли в основу новых инновационных подходов в использовании фармакологических средств для ограничения цитотоксических и иммуномодулирующих функций нейтрофилов, ограничения их деструктивного потенциала, а также изменения баланса сигнальных молекул, стимулирующих или ингибирующих их активность [57, 59].

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–2, 4–46, 48–51, 53–60  
см. REFERENCES)

3. Тотолян А.А., Фрейдлин И.С. *Клетки иммунной системы*. СПб.: Наука; 2000.
47. Андрюков Б.Г., Сомова Л.М., Тимченко Н.Ф. Стратегии программированной клеточной гибели у прокариот. *Инфекция и иммунитет*. 2015; 5 (1): 15–26.
52. Коротина О.Л., Генералов И.И. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: механизмы образования, функции. *Имунопатология, аллергология, инфектология*. 2012; (4): 23–32.

REFERENCES

1. Mayadas T.N., Cullere X., Lowell C.A. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu. Rev. Pathol.* 2014; 9: 181–218.
2. Akira S. Toll receptor families: structure and function. *Semin. Immunol.* 2004; 16 (1): 1–2.
3. Totolyan A.A., Freydlin I.S. *Immune System Cells [Kletki immunnnoy sistemy]*. St. Petersburg: Nauka; 2000. (in Russian)
4. Gardiner E.E., Andrews R.K. Neutrophil extracellular traps (NETs) and infection-related vascular dysfunction. *Blood Rev.* 2012; 26 (6): 255–9.
5. Behnen M., Leschczyk C., Möller S., Batel T., Klinger M., Solbach W. et al. Immobilized immune complexes induce neutrophil extracellular trap release by human neutrophil granulocytes via FcγRIIIB and Mac-1. *J. Immunol.* 2014; 193: 1954–65.
6. Carestia A., Rivadeneyra L., Romaniuk M.A., Fondevila C., Negrotto S., Schattner M. Functional responses and molecular mechanisms involved in histone-mediated platelet activation. *Thromb. Haemost.* 2013; 110: 1035–45.
7. Amulic B., Cazalet C., Hayes G.L., Metzler K.D., Zychlinsky A. Neutrophil function: From mechanisms to disease. *Annu. Rev. Immunol.* 2012; 30: 459–89.
8. Ionita M.G., van den Borne P., Catanzariti L.M., Moll F.L., de Vries J.P. High neutrophil numbers in human carotid atherosclerotic plaques are associated with characteristics of rupture-prone lesions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2010; 30: 1842–8.
9. Jaeger B.N., Donadieu J., Cognet C., Bernat C., Ordonez-Rueda D. Neutrophil depletion impairs natural killer cell maturation, function, and homeostasis. *J. Exp. Med.* 2012; 209: 565–80.
10. Gui T., Liu X., Tao J., Chen J., Li Y., Zhang M. et al. Validation of a recombinant human bactericidal/permeability-increasing protein (hBPI) expression vector using marine mammary gland tumor cells and the early development of hBPI transgenic goat embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 2013; 143 (1–4): 48–56.
11. Fuchs T.A., Brill A., Duerschmied D., Schatzberg D., Monestier M., Myers D.D. Jr. et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010; 107: 14 390–5.
12. Tamassia N., Le Moigne V., Calzetti F., Donini M., Gasperini S., Ear

- T. et al. The MyD88-independent pathway is not mobilized in human neutrophils stimulated via TLR4. *J. Immunol.* 2007; 178: 7344–56.
13. Galdiero M.R., Bonavita E., Barajon I., Garlanda C., Mantovani A. Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. *Immunobiology.* 2013; 218: 1402–10.
14. Branzk N., Papayannopoulos V. Molecular mechanisms regulating NETosis in infection and disease. *Semin. Immunopathol.* 2013; 35 (4): 513–30.
15. Martinod K., Wagner D.D. Thrombosis: tangled up in NETs. *Blood.* 2014; 123 (18): 2768–76.
16. Fernandez-Borja M., van Buul J.D., Hordijk P.L. The regulation of leucocyte transendothelial migration by endothelial signalling events. *Cardiovasc. Res.* 2010; 86: 202–10.
17. Woodfin A., Voisin M.B., Nourshargh S. Recent developments and complexities in neutrophil transmigration. *Curr. Opin. Hematol.* 2010; 17: 9–17.
18. György B., Tóth E., Tarcsa E., Falus A., Buzás E.I. Citrullination: A posttranslational modification in health and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2006; 38: 1662–77.
19. Nordenfelt P., Tapper H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 2011; 90: 271–84.
20. Parker H., Dragunow M., Hampton M.B., Kettle A.J., Winterbourn C.C. Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. *J. Leukoc. Biol.* 2012; 92: 841–9.
21. Hakkim A., Fürnrohr B.G., Amann K., Laube B., Abed U.A., Brinkmann V. et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010; 107: 9813–8.
22. Kobayashi Y. Neutrophil biology: an update. *EXCLI J.* 2015; 14: 220–7.
23. Harris E.S., Weyrich A.S., Zimmerman G.A. Lessons from rare maladies: leukocyte adhesion deficiency syndromes. *Curr. Opin. Hematol.* 2013; 20: 16–25.
24. Naegelen I., Beaume N., Plançon S., Schenten V., Tschirhart E.J., Bréhard S. Regulation of Neutrophil Degranulation and Cytokine Secretion: A Novel Model Approach Based on Linear Fitting. *J. Immunol. Res.* 2015; 2015: 817 038.
25. Soehnlein O., Weber C., Lindbom L. Neutrophil granule proteins tune monocytic cell function. *Trends Immunol.* 2009; 30: 538–46.
26. Malcolm K.C., Worthen G.S. Lipopolysaccharide stimulates p38-dependent induction of antiviral genes in neutrophils independently of paracrine factors. *J. Biol. Chem.* 2003; 278 (18): 15 693–701.
27. Abi Abdallah D.S., Egan C.E., Butcher B.A., Denkers E.Y. Mouse neutrophils are professional antigenpresenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation. *Int. Immunol.* 2011; 23: 317–26.
28. Diana J., Simoni Y., Furio L., Beaudoin L., Agerberth B. Crosstalk between neutrophils, B-1a cells and plasmacytoid dendritic cells initiates autoimmune diabetes. *Nat. Med.* 2013; 19: 65–73.
29. Hong Y., Eleftheriou D., Hussain A.A., Price-Kuehne F.E., Savage C.O. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies stimulate release of neutrophil microparticles. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2012; 23: 49–62.
30. Keshari R.S., Jyoti A., Dubey M., Kothari N., Kohli M., Bogra J. et al. Cytokines induced neutrophil extracellular traps formation: implication for the inflammatory disease condition. *PLoS One.* 2012; 7 (10): e48 111.
31. Knight J.S., Carmona-Rivera C., Kaplan M.J. Proteins derived from neutrophil extracellular traps may serve as self-antigens and mediate organ damage in autoimmune diseases. *Front. Immunol.* 2012; 3: 380.
32. Koelink P.J., Overbeek S.A., Braber S., Morgan M.E., Henrickes P.A. Collagen degradation and neutrophilic infiltration: a vicious circle in inflammatory bowel disease. *Gut.* 2014; 63 (4): 578–87.
33. Schorn C., Janko C., Krenn V., Zhao Y., Munoz L.E., Schett G. Bonding the foe – NETting neutrophils immobilize the pro-inflammatory monosodium urate crystals. *Front. Immunol.* 2012; 3: 376.
34. Kolaparthi L.K., Sanivarapu S., Swarna C., Devulapalli N.S. Neutrophil extracellular traps: Their role in periodontal disease. *J. Indian Soc. Periodontol.* 2014; 18 (6): 693–7.
35. Brinkmann V., Goosmann C., Kühn L.I., Zychlinsky A. Automatic



- quantification of in vitro NET formation. *Front. Immunol.* 2013; 3: 413.
36. Radic M., Kaplan M.J. Extracellular chromatin traps interconnect cell biology, microbiology, and immunology. *Front. Immunol.* 2013; 4: 160.
37. Brinkmann V., Laube B., Abu Abed U., Goosmann C., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: how to generate and visualize them. *J. Vis. Exp.* 2010; (36). pii: 1724.
38. Lande R., Ganguly D., Facchinetti V., Frasca L., Conrad C., Gregorio J. et al. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.* 2011; 3 (73): 73–19.
39. Remijsen Q., Van den Berghe T., Wirawan E., Asselbergh B., Parthoens E., De Rycke R. Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res.* 2011; 21: 290–304.
40. Brinkmann V., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J. Cell Biol.* 2012; 198: 773–83.
41. Li P., Li M., Lindberg M.R., Kennett M.J., Xiong N., Wang Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J. Exp. Med.* 2010; 207: 1853–62.
42. Lood C., Blanco L.P., Purmalek M.M., Carmona-Rivera C., De Ravin S.S., Smith C.K. et al. Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. *Nat. Med.* 2016; 22 (2): 146–53.
43. Liaw P.C., Ito T., Iba T., Thachil J., Zeerleder S. DAMP and DIC: The role of extracellular DNA and DNA-binding proteins in the pathogenesis of DIC. *Blood Rev.* 2015; pii: S0268-960X (15)00097-1.
44. Kain R., Firmin D.A., Rees A.J. Pathogenesis of small vessel vasculitis associated with autoantibodies to neutrophil cytoplasmic antigens: new insights from animal models. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2010; 22: 15–20.
45. Levy O. A neutrophil-derived anti-infective molecule: bactericidal/permeability-increasing protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000; 44 (11): 2925–31.
46. Mankovich A.R., Lee C.Y., Heinrich V. Differential effects of serum heat treatment on chemotaxis and phagocytosis by human neutrophils. *PLoS One.* 2013; 8 (1): e54 735.
47. Andryukov B.G., Somova L.M., Timchenko N.F. Strategy of programmed cell death in prokaryotes. *Infektsiya i immunitet.* 2015; 5 (1): 15–26. (in Russian)
48. Mantovani A., Cassatella M.A., Costantini C., Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2011; 11: 519–31.
49. Metzler K.D., Fuchs T.A., Nauseef W.M., Reumaux D., Roesler J., Schulze I. et al. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: Implications for innate immunity. *Blood.* 2010; 3 (17): 36–43.
50. Mócsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J. Exp. Med.* 2013; 210 (7): 1283–99.
51. Radford-Smith G., Jewell D. P. Cytokines and inflammatory bowel disease. *Baillieres Clin. Gastroenterol.* 1996; 10 (1): 151–64.
52. Korotina O.L., Generalov I.I. Neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation and function. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya.* 2012; (4): 23–32. (in Russian)
53. Sun L., Wang H., Wang Z., He S., Chen S., Liao D. et al. Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell.* 2012; 148 (1–2): 213–27.
54. Vandenabeele P., Galluzzi L., Vanden Berghe T., Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010; 11 (10): 700–14.
55. Yousefi S., Mihalache C., Kozlowski E., Schmid I., Simon H.U. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ.* 2009; 16 (11): 1438–44.
56. Neeli I., Dwivedi N., Khan S., Radic M. Regulation of extracellular chromatin release from neutrophils. *J. Innate Immun.* 2009; 1 (3): 194–201.
57. Farrera C., Fadeel B. Macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a silent process. *J. Immunol.* 2013; 191: 2647–56.
58. Sangaletti S., Tripodo C., Chiodoni C., Guarnotta C., Cappetti B., Casalini P. Neutrophil extracellular traps mediate transfer of cytoplasmic neutrophil antigens to myeloid dendritic cells toward ANCA induction and associated autoimmunity. *Blood.* 2012; 120: 3007–18.
59. Wang Y., Li P., Wang S., Hu J., Chen X.A., Wu J. et al. Anticancer peptidylarginine deiminase (PAD) inhibitors regulate the autophagy flux and the mammalian target of rapamycin complex 1 activity. *J. Biol. Chem.* 2012; 287 (31): 25 941–53.
60. Leshner M., Wang S., Lewis C., Zheng H., Chen X.A., Santy L. PAD4 mediated histone hypercitullination induces heterochromatin decondensation and chromatin unfolding to form neutrophil extracellular trap-like structures. *Front. Immunol.* 2012; 3: 307.

Поступила 30.05.16  
Принята к печати 15.06.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.373:579.852.11

Баркова И.А., Червакова М.П., Барков А.М., Новоженина А.В., Викторов Д.В.

## ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ИММУНОДОМИНАНТНЫХ БЕЛКОВ ИЗОГЕННЫХ ВАРИАНТОВ *BACILLUS ANTHRACIS*

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, 400131, г. Волгоград

Получены поликлональные моноспецифические сыворотки к белкам токсина и антигенам S-слоя *Bacillus anthracis*, выделенным в препаративном электрофорезе. При применении метода флуоресцирующих антител (МФА) иммуноглобулины сывороток к белку S-слоя *B. anthracis* м.м. 94 кДа обладали специфичностью и специфической активностью на представленном количестве штаммов, а в пробах почвы обнаруживали споры в концентрации  $1 \cdot 10^4$  КОЕ/мл, что позволяет рекомендовать данные иммуноглобулины для индикации *B. anthracis*. Белки м.м. 90 кДа, относящиеся к антигенам токсина *B. anthracis*, в иммуноблоттинге реагировали с сыворотками больных кожной формой сибирской язвы и морских свинок, иммунизированных и выживших после заражения. Сыворотки к ним видоспецифичны, могут быть использованы для диагностики заболевания (обнаружение протективного антигена) и определения продукции белков в реакции иммунодиффузии с растущими культурами (РИДРК).

Ключевые слова: культуральные фильтраты; препаративный электрофорез; белки м.м. 94, 87, 90 кДа *Bacillus anthracis*; иммуноблоттинг; метод флуоресцирующих антител (МФА).

Для цитирования: Баркова И.А., Червакова М.П., Барков А.М., Новоженина А.В., Викторов Д.В. Диагностическое значение некоторых иммунодоминантных белков изогенных вариантов *Bacillus anthracis*. Клиническая лабораторная диагностика. 2016; 61 (12): 833-837. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2016-61-12-833-837>

Для корреспонденции: Баркова Ирина Анатольевна – канд. мед. наук, доц., зав. лаб. оперативной диагностики бактериальных и вирусных инфекций, e-mail: barina\_10@mail.ru