

УДК 616.155.34:577.213.7

Нейтрофильные внеклеточные ловушки: механизмы образования, функции

О.Л.Коротина, И.И.Генералов

Витебский государственный медицинский университет, г. Витебск, Беларусь

Neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation, functions

O.L.Korotina, I.I. Generalov

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

Аннотация

В статье приведены современные данные о новом механизме антимикробного действия нейтрофильных гранулоцитов – образовании нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ). Рассматриваются условия и этапы формирования НВЛ, их отличия от процессов апоптоза и некроза нейтрофилов. Дана характеристика основных структурных компонентов НВЛ и факторов, стимулирующих их появление. Излагаются механизмы антимикробного действия нейтрофильных ловушек, сравнивается эффективность элиминации патогенов посредством образования НВЛ и фагоцитоза. Приводятся основные инфекционные и иммуновоспалительные заболевания, при которых проводилось изучение НВЛ, обсуждается участие нейтрофильных ловушек в их патогенезе. Рассмотрены некоторые лабораторные методы обнаружения НВЛ.

Ключевые слова

Нейтрофильные гранулоциты, нейтрофильные внеклеточные ловушки, система иммунитета, ДНК.

Образование внеклеточных ловушек как базовая функция нейтрофилов

Изучение строения, физиологии нейтрофильных гранулоцитов, биохимического состава их гранул, структуры синтезируемых ими метаболитов, механизмов операции с другими клетками по-прежнему остается весьма актуальным [1, 2, 3, 4]. В первую очередь это определяется той активной ролью, которую они играют в реакциях врожденного и приобретенного иммуни-

Summary

This article highlights the current data concerning a new mechanism of antimicrobial action of neutrophilic granulocytes – neutrophil extracellular traps (NETs). The conditions and basic stages of NETs formation are described emphasizing the difference between apoptosis, necrosis and NETs maturation. Main inducers and constituents of NETs are characterized. The mechanisms of antimicrobial activity of NETs are consolidated to compare their efficacy in pathogen elimination with conventional phagocytosis. Broad scope of infectious and inflammatory diseases where NETs were studied is given and putative role of neutrophil traps in their pathogenesis is discussed. A number of laboratory methods currently available for NETs determination is revised.

Keywords

Neutrophils, neutrophil extracellular traps, immune system, DNA.

тета, а также в поддержании гомеостаза организма в целом [5].

Основной функцией нейтрофильных гранулоцитов является фагоцитоз. Объектами фагоцитоза обычно являются биологические агенты, имеющие корпускулярную структуру (бактериальные и грибковые патогены, клетки простейших, собственные поврежденные клетки и продукты их распада). Нейтрофилы поглощают и переваривают захваченные микроорганизмы с использованием кислородзависимых и

кислороднезависимых механизмов, что приводит к их элиминации [6].

В цитоплазме нейтрофилов содержится три основных типа гранул – первичные (азурофильные), вторичные (специфические) и третичные [7].

Первичные азурофильные гранулы включают миелопероксидазу (МПО), необходимую для ферментативного преобразования H_2O_2 в хлорноватистую кислоту (НОСl). Они также содержат эластазу нейтрофилов и белки-дефензины – низкомолекулярные положительно заряженные антимикробные пептиды [8]. Дефензины встраиваются в микробную оболочку с нарушением ее целостности [9]. Также они могут разрушать ДНК бактерий [10].

Вторичные гранулы содержат лизоцим, лактоферрин, желатиназу и металлопротеазы. Их мембраны также содержат до 95% цитохрома B_{558} , составного компонента фермента NADPH-оксидазы (никотинамид-аденин-динуклеотид-фосфат-оксидазы).

Основным ферментом третичных гранул является желатиназа.

Нейтрофилы обладают способностью реагировать даже на незначительные изменения окружающей среды, используя обширный набор мембранных рецепторов из разных семейств. На их мембранах представлены, например, Толл-подобные рецепторы (TLR), Fc-рецепторы для иммуноглобулинов различных классов, в первую очередь – IgG, рецепторы для компонентов комплемента (C3b и других), что обеспечивает эффективную опсонизацию объектов фагоцитоза [11, 12, 13, 14].

В инфицированных тканях нейтрофильные гранулоциты сталкиваются с микроорганизмами и активируются, поглощая возбудителя в вакуоли (фагосомы). Далее гранулы нейтрофилов сливаются с фагосомой, образуя фаголизосомы, в которые попадают антимикробные пептиды и ферменты [15]. При этом в фаголизосоме микроорганизмы подвергаются воздействию высоких концентраций активных форм кислорода (АФК) [16].

Кислород-зависимый механизм антимикробной активности известен как респираторный взрыв. При нем происходит немитохондриальное накопление активных форм кислорода [17].

Образование АФК обеспечивает фермент NADPH-оксидаза. При этом окончательная сборка NADPH-оксидазы происходит в мембране фаголизосомы с объединением 4-х фосфорилированных цитозольных субъединиц фер-

мента (p47-phox, p40-phox, p67-phox и Rac) и двух субъединиц цитохрома B_{558} из гранул фагоцита (gp91phox и p22phox). NADPH-оксидаза фагоцита восстанавливает кислород до супероксид-аниона (O_2^-) который далее спонтанно или под действием супероксиддисмутазы (СОД) фагоцитов превращается в H_2O_2 . Под влиянием миелопероксидазы нейтрофилов из перекиси водорода образуется хлорноватистая кислота (НОСl), которая повреждает нуклеиновые кислоты и белки бактериальных клеток. В свою очередь каталаза разлагает перекись водорода на воду и кислород с образованием гидроксильных радикалов, которые также разрушают микробные клетки [18, 19, 20].

Кроме того, АФК обладают непрямым антимикробным эффектом, активируя протеолитические ферменты гранул нейтрофилов [21].

Вышеприведенные механизмы наиболее характерны при активации нейтрофилов патогенными или условно-патогенными микроорганизмами. При этом в окружающую среду секретуется широкий набор провоспалительных цитокинов [21].

Считается, что иным образом происходит взаимодействие нейтрофилов с непатогенными представителями нормальной микрофлоры слизистых оболочек. Гранулоциты плохо фагоцитируют эти бактерии. Наиболее вероятно, что связывание компонентов их микробной стенки с паттерн-распознающими рецепторами нейтрофилов приводит к активации NADPH-оксидазы и внутриклеточных мессенджеров лейкоцитов. В последующем происходит секреторная дегрануляция, высвобождая из гранул антиадгезивные и микробицидные факторы [22, 23].

Долгое время нейтрофилы рассматривались только как неспецифические эффекторные клетки врожденного иммунитета, реализующие все вышеуказанные функции. После выполнения своей биологической программы нейтрофил погибает. Наиболее вероятным исходом дифференцированных нейтрофилов считался апоптоз после фагоцитоза или возможный некроз под действием фактором патогенности возбудителей [2].

Показано, что фагоцитарная активность нейтрофила меняет экспрессию ряда генов; в результате после фагоцитоза гранулоцит подвергается апоптозу. В качестве активатора этого процесса выступает респираторный взрыв [24, 25]. Апоптоз гранулоцитов является жизненно важным процессом для успешного разрешения бактериальной инфекции.

В свою очередь, факторы патогенности бактерий, вызывающие повреждение и некроз лейкоцитов (например, порообразующие токсины золотистого стафилококка), нарушают целостность внешней лейкоцитарной мембраны, приводят к потере сегментации ядра нейтрофила с потерей дифференциации между эу- и гетерохроматином. Однако при этом мембраны ядра и гранул в начальный период сохраняются [26]. Гибель клетки сопровождается разрушением клеточной оболочки нейтрофила, при этом флогенные факторы, попадая в окружающую среду, могут приводить к воспалительным изменениям [2].

Сравнительно недавно был описан новый механизм антимикробного действия нейтрофилов. Оказалось, что нейтрофильные гранулоциты после активации выбрасывают во внеклеточное пространство сетеподобные структуры, в состав которых входит ДНК, гистоны, а также различные белки и ферменты гранул, такие как эластаза и миелопероксидаза. Эти структуры были названы как «нейтрофильные внеклеточные ловушки» (Neutrophil Extracellular Traps, NETs или НВЛ) [27]. Изначально цель данного явления была неясна. Тем не менее, сразу было высказано предположение, что сетеподобные структуры изолируют и уничтожают грамположительные и грамотрицательные бактерии, грибковые патогены [27, 28]. Позднее подобное явление было обнаружено у тучных клеток и эозинофилов [29].

Следует отметить, что процессы, напоминающие образование НВЛ, упоминались и в более ранних источниках.

В частности, было известно, что производное кротонного масла форбол-1,2-миристат-1,3-ацетат или ФМА [30] является мощным активатором нейтрофилов через систему «протеинкиназа С – диацилглицерол – внутриклеточные ионы кальция». ФМА является липофильным веществом, поэтому может оказывать цитотоксический эффект на нейтрофилы. Он действует быстро за счет относительно короткого сигнального пути, обходя взаимодействия с клеточными рецепторами. При активации нейтрофила посредством ФМА происходит потеря сегментации ядра, деконденсация хроматина (теряются различия между эухроматином и гетерохроматином) с последующим распадом ядерной мембраны. Органеллы остаются нетронутыми, а проницаемость клеточной мембраны гранулоцита увеличивается только на поздних сроках после активации. Целостность внешней

мембраны активированных таким образом гранулоцитов не влияет на разрушение внутренних мембран, позволяющих смешивание внутриклеточных компонентов нейтрофила. Этот процесс прямо зависит от образования АФК [31]. Вероятнее всего, это одно из первых описаний формирования НВЛ [26].

Образование внеклеточных ловушек (или NETosis, «нетоз») является еще одним вариантом судьбы нейтрофильного лейкоцита. При этом процесс гибели гранулоцита существенно отличается от апоптоза и некроза, которые были изучены ранее [31]. Исследования показали, что образование сетей является контролируемым процессом, а не случайным выделением гранул и ядерного содержимого клетки, как во время некроза или апоптоза. Установлено, что сети могут формироваться как альтернатива фагоцитозу [32]. По сравнению с апоптозом и некрозом наиболее важными морфологическими различиями при нетозе являются распад ядерной оболочки и смешивание ядерного и цитоплазматического материала, потеря внутренней мембраны и исчезновение цитоплазматических органелл. Апоптоз нейтрофила является строго регулируемым ответом, который стремится предотвратить попадание содержимого клетки в межклеточное пространство. Нетоз, напротив, направлен на контролируемое высвобождение внутриклеточных компонентов гранулоцита. Данный процесс также подлежит строгой регуляции [26]. В отличие от апоптоза он стимулируется АФК, но не зависит от каспаз. При этом фрагментации ДНК не происходит, однако наблюдается разрушение ядерной мембраны [33].

В свою очередь, основным отличием некроза от процесса формирования НВЛ также являются морфологические изменения ядра, предшествующие образованию сетей. Во время некроза оболочка ядра остается обычно неизменной, в то время как в процессе образования сети ядерные мембраны распадаются на множество пузырьков. В результате компоненты ядра и гранул смешиваются. Еще одним отличием при образовании внеклеточных ловушек является необходимость специфической активации нейтрофила с участием NADPH оксидазы.

Кроме того, возникают частые ситуации, когда поглощаемый объект слишком велик для фагоцитоза, например, при паразитарных инфекциях. И в таких случаях нейтрофилы уничтожают или, по крайней мере, ограничивают распространение патогена путем образования НВЛ [34].

Доказано, что способностью к образованию внеклеточных сетей обладает подавляющее большинство нейтрофильных гранулоцитов [26]. Это свидетельствует в пользу того, что у нейтрофилов, в том числе в естественных условиях, существуют механизмы регулирования программы запуска, которая завершается формированием НВЛ [27, 28]. Кроме того, это является последним шагом в программе активной контролируемой клеточной гибели нейтрофилов.

По мнению исследователей, работающих в этом направлении, формирование нейтрофилами внеклеточных ловушек является важным механизмом врожденного иммунного ответа, при котором гранулоцит защищает организм от основных инфекционных патогенов [35, 36].

К настоящему времени механизм образования НВЛ на основании имеющихся литературных данных [26, 37, 38] может выглядеть следующим образом.

Процесс образования НВЛ начинается с активации нейтрофила. Происходит запуск мембранно-связанного мультимолекулярного ферментного комплекса NADPH-оксидазы индукторами самой разнообразной природы. Параллельно активируется протеинкиназа С, участвующая во внутриклеточной передаче большого набора внешних сигналов. Активируются процессы дыхательного взрыва. Возникают активные формы кислорода, индуцирующие набор ключевых ферментов нейтрофилов (нейтрофильную эластазу и пептидил-аргинин-деиминазу-4 или PAD-4). Происходит превращение аргинина и остатков метиларгинина в цитруллин (реакция цитруллинации гистонов) в гистоновых белках ядра. Следствием этого является деконденсация хроматина и высвобождение ДНК.

По истечении короткого периода времени после стимуляции клетки ядра нейтрофилов начинают терять свои сегменты, хотя ядерная оболочка еще остается неповрежденной. В то же время пространство между внутренней и внешней ядерными мембранами расширяется. В результате ядерная оболочка распадается на множество мелких пузырьков и деконденсированный хроматин. Эти пузырьки возникают из оболочки ядра.

Далее гранулы нейтрофила растворяются и внутриклеточные компоненты распределяются по всему объему цитоплазмы [37, 39].

Для изучения стадий морфологических изменений, приводящих к формированию лову-

шек, использовали методы флуоресцентной и трансмиссионной электронной микроскопии. В среднем через 1 ч после стимуляции клеток ядра нейтрофилов теряют свои дольки, деконденсируется хроматин. Через 2 ч из ядерной мембраны начинают формироваться отдельные пузырьки, затем нуклеолема распадается на множество мелких пузырьков, и происходит высвобождение хроматина в цитоплазму. Структура цитоплазматических гранул изменяется, разрушаются их мембраны. Через 3 ч большинство гранул исчезает.

В процессе активации нейтрофилов индуцируется клеточная сигнальная система, включающая фосфатидил-инозитол-3-киназу и серинтреонин киназу (СТК), которая отвечает за синтез белков, функцию микротрубочек и аутофагию нейтрофила. Эта система принимает участие в дезинтеграции и разрыве клеточной мембраны во время «нетоза» [40]. После активации цитоскелета происходит сокращение клетки до тех пор, пока не разорвется внешняя мембрана. Высокоактивная смесь, попав во внеклеточное пространство, формирует своеобразную объемную сеть-«ловушку», в которую и попадают бактерии. Нейтрофил при этом погибает. Эта кислородзависимая клеточная гибель была названа термином «NETosis» [40].

В процессе образования НВЛ совместно с деконденсированным хроматином (ДНК и гистонами) высвобождаются протеазы и антимикробные пептиды, содержащиеся в гранулах нейтрофилов. Белки в ловушки выводятся из всех трех типов гранул нейтрофилов. Из азурофильных первичных гранул в НВЛ попадают эластаза, катепсин G и МПО. Специфические (вторичные) гранулы являются источником лактоферрина, третичные гранулы – желатиназы. Кроме того, в сетях обнаруживаются многочисленные белки, вовлекающие в активацию клеточное микроокружение ловушек. Например, был обнаружен, антимикробный пептид LL3 – продукт распада гранулярного белка кателицидина [41]. Этот пептид самостоятельно конвертирует ДНК в активную форму, способную стимулировать плазмациитоидные дендритные клетки с последующим высвобождением цитокинов (ИФН- α и др) [42].

Нити ДНК сетей могут обеспечить основу для адгезии и последующей контактной активации калликреин-кининовой системы и факторов системы свертывания крови [43].

Показано, что сериновая протеаза (фактор XII) и высокомолекулярный кининоген способ-

ны связываться с НВЛ, что приводит к активации брадикинина и калликреина плазмы, стимуляции воспалительных реакций и процессов гемокоагуляции. Подобного не происходит в нестимулированных нейтрофилах, при этом сама активация может быть блокирована добавлением ДНКазы. Предполагается, что таким образом НВЛ в естественных условиях могут усиливать врожденный иммунный ответ [43].

В целом в процессе формирования ловушек антимикробные компоненты нейтрофилов (микробицидные ферменты, антибактериальные катионные белки, нейтральные сериновые протеазы, металлопротеиназы, кислые гидролазы, продукты респираторного взрыва – перекись водорода, гидроксильный радикал, галогены, атомарный кислород, оксид азота, пероксинитрит и другие, в том числе и миелопероксидаза) связываются внутриклеточно с нитями ДНК нейтрофила, и секретируются во внеклеточное пространство, образуя нейтрофильные внеклеточные ловушки, ограничивая повреждение близлежащих тканей. Бактерии задерживаются в этих структурах и разрушаются [33].

Формирование НВЛ в норме и при различных патологических состояниях

Секретируемые в пространство ловушки продукты нейтрофилов обладают избирательной бактерицидностью. Они подавляют рост патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, но слабо влияют на непатогенные микроорганизмы, в частности лакто- или бифидобактерии [28].

Это может быть обусловлено различиями в механизмах стимуляции нейтрофилов патогенными и непатогенными возбудителями. Ранее было установлено, что внутриклеточные киллинговые системы нейтрофилов в большей степени активируются *E. coli* и *S. aureus*, чем *Lactobacterium spp.* и *Bifidobacterium spp.* [44, 45]. Кроме того, клетки секретируют разный набор антимикробных медиаторов при активации нейтрофилов через отдельные группы рецепторных молекул, например, образ-распознающие рецепторы семейств TLR, NOD и других.

Опсонизация бактерий (например, взаимодействие специфических IgG с оболочкой *S. aureus*) также стимулирует выработку НВЛ, действуя через Fcγ-рецепторы лейкоцитов [33].

Очевидно, что наряду с микробной стимуляцией, образование ловушек также регулируется многочисленными внешними факторами и сигналами.

Провоцируют формирование ловушек провоспалительные агенты, такие как интерлейкин-8, липополисахарид (ЛПС) или форболмирицилат. В свою очередь, ингибитор NADPH-оксидазы дифенилен-иодоний предупреждает образование НВЛ. По отдельности IL-8 и ЛПС высвобождают ловушки менее эффективно, чем бактерии. Оптимальное образование НВЛ лейкоцитами требует активации через несколько рецепторов [26].

С другой стороны, оказалось, что нейтрофилы цельной крови и ее лейкоцитарной взвеси в норме не образуют спонтанных НВЛ, несмотря на периодическое увеличение концентрации активаторов в сыворотке [28].

Это свидетельствует в пользу того, что в кровяном русле здоровых лиц формирование НВЛ не должно происходить, так как это может привести к окклюзии хлопьями ДНК мелких сосудов. Многими авторами показано, что формирование НВЛ в кровотоке механически нарушает кровообращение в тканях и органах [46] и способствует развитию различных патологических состояний [47, 48, 49], в том числе и аутоиммунных [37, 50].

Установлено, что ингибирующие факторы крови имеют гуморальную природу. Аутологичные сыворотка и плазма крови ингибируют внеклеточный выброс ДНК нейтрофилами, выделенными из периферической крови.

Таким образом, в системном кровотоке в отсутствие воспаления образование НВЛ подавляется.

Иная ситуация возникает с развитием инфекционной или аутоиммунной патологии.

НВЛ наблюдали при многих заболеваниях самого различного происхождения. Brinkmann V. и соавт., 2004 г. описали ловушки при аппендиците и экспериментальном шигеллезе, Gupta A.K. и соавт., 2005 г. – при гестозе (преэклампсии), Kessenbrock K. и соавт., 2009 г. – при васкулите, поражающем сосуды микроциркуляции и т.д. [27, 39, 41].

Clark с соавт. в 2007 г. установили, что с развитием тяжелого сепсиса тромбоциты после связывания ЛПС бактерий становятся активными индукторами НВЛ в сосудах микроциркуляции, что может приводить к их повреждению [46].

Заболевания и патологические процессы, при которых установлено образование НВЛ, представлены в таблице 1.

При хронической гранулематозной болезни показана зависимость НВЛ от продукции АФК.

Таблица 1. Образование НВЛ при различных видах патологии у животных и человека

Вид патологии	Организм	Источник
Аппендицит	Человек	Brinkmann V. et all., 2004 [27]
Преэклампсия	Человек	Gupta A.K. et all., 2005 [39]
Сепсис (в образцах крови)	Человек (активация <i>in vitro</i>)	Clark S.R. et all., 2007 [46]
Тропическая малярия	Человек	Baker V. et all., 2008 [51]
Периодонтит	Человек (в естественных условиях)	Vitkov L. et all. 2009 [52]
Аспергиллез (грибы: <i>Aspergillus nidulans</i> конидии)	Человек (<i>in vitro</i>)	Bianchi M. et all., 2009 [53]
Васкулит, поражающий сосуды микроциркуляции	Человек (<i>in vitro</i> и в естественных условиях)	Kessenbrock K. et all., 2009 [41]
Лейшманиоз (паразит: <i>Leishmania amazonensis</i>)	Человек (<i>in vitro</i> и в естественных условиях)	Guimaraes-Costa A. B. et all., 2009 [54]
Туберкулез	Человек	Ramos-Kichik V. et all., 2009 [55]
Септический артрит (в синовиальной жидкости)	Человек (<i>in vitro</i> и в естественных условиях)	Luqters T. et all., 2009 [49]
Инсеминация (репродуктивный тракт)	Лошадь (активация нейтрофилов <i>in vitro</i>)	Alghamdi A. S. et all. 2005 [56]
Экспериментальная инфекция – некротизирующий фасциит (стрептококки группы А)	Мышь	Buchanan J. T. et all. 2006 [57]
Мастит	Крупный рогатый скот	Lippolis V. et all., 2006 [32]
Экспериментальный шигеллез	Кролик	Brinkmann V. et all., 2004 [27]
Средний отит (экспериментальная пневмококковая инфекция, инфекция <i>Haemophilus influenza</i>)	Кролики (в естественных условиях)	Reid S D. et all., 2009 [58], Hong W. Z. et all., 2009 [59]
Кошачий вирус лейкемии (<i>L. amazonensis</i>)	Кошачьи (<i>in vitro</i>)	Wardini A.B. et all., 2010 [60]
Паразитарная инфекция, вызванная <i>Eimeria bovis</i>	Крупный рогатый скот	Behrendt J. H. et all., 2010 [61]

Известно, что нейтрофилы пациентов с хронической гранулематозной болезнью не способны генерировать АФК из-за дефицита фермента NADPH-оксидазы. В свою очередь, нейтрофилы данных пациентов оказались не в состоянии формировать НВЛ. Тем не менее, фермент глюкозооксидаза, по крайней мере – частично, компенсировал функциональную недостаточность NADPH-оксидазы для выработки перекиси водорода. При этом под действием глюкозооксидазы образование НВЛ значительно увеличилось. В качестве ингибитора реакции использовали дифенилен-иодоний. [33].

Вирусная инфекция также может влиять на формирование НВЛ. В эксперименте на животных вирус лейкемии кошек (FeLV) усиливал спонтанное образование ловушек лейкоцитами,

однако снижал их активность при развитии оппортунистических инфекций [60, 62].

Чрезмерная продукция NET может привести к патологическим состояниям [38].

Имеются данные, что повышенное образование либо нарушение удаления (клиренса) НВЛ связаны с хроническими иммуновоспалительными неинфекционными заболеваниями, такими как васкулит, системная красная волчанка, гестозы (преэклампсия) [41, 39, 63, 64, 65].

Преэклампсия, возникающая в период беременности, характеризуется гипертонией, вызванной иммунной реакцией плаценты. Плацента выделяет циркулирующие пептиды, таких как микрочастицы синцитиотрофобластов (МСТБ), способствующие запуску общего материнского иммунного ответа. Gupta и соавт.

обнаружили значительное количество сетей в межворсинчатом пространстве плаценты одновременно с активным образованием НВЛ, содержащих МСТБ [39].

Васкулит, поражающий сосуды микроциркуляции, является аутоиммунным заболеванием, при котором также были обнаружены НВЛ. Образующиеся аутоантитела к цитоплазме нейтрофилов (ANCA) направлены против белков гранул нейтрофилов, таких как протеиназа-3 (PR3) и МПО. Аутоантитела активно участвуют в патогенезе системного васкулита. Установлено, что взаимодействие аутоантител с PR3 и МПО стимулирует дыхательный взрыв [66]. В свою очередь, Kessenbrock и др. (2009) показали, что после выделения нейтрофилов ANCA, по крайней мере, *in vitro* стимулируют выработку НВЛ. Эти результаты также подтверждают связь между продукцией АФК и формированием НВЛ [41].

Подобные явления наблюдали и при системной красной волчанке [67].

В связи со всеми вышеперечисленными данными можно заключить, что с одной стороны, НВЛ функционируют как эффективный антимикробный барьер, с другой – их избыток ведет к развитию воспалительных процессов и к гемодинамическим расстройствам в случае неполноценности противодействующих регуляторных механизмов.

Нейтрофилы являются, прежде всего, тканевыми клетками, участвующими в воспалительных и антимикробных реакциях. Они также активно функционируют и в слизистом биослое [2, 68].

Очевидно, что нарушения мукозального иммунитета способствуют рецидивирующему течению и хронизации местных воспалительных процессов [69, 70, 71].

По мнению ряда авторов, формирование НВЛ является механизмом защиты, действующим в тканях и на поверхности слизистых оболочек, причем особенно важным в противоинфекционной защите слизистых [2].

Нейтрофилы, покидая ткани и выходя на поверхность слизистых оболочек, могут участвовать в антимикробной защите и в регуляции микробиоценозов соответствующих биотопов, секретировав биоцидные продукты [2, 72].

Кроме того, агрессивные факторы гранул нейтрофила в сформированной ловушке, связаны нитями ДНК [33]. В случае колонизации тканей или слизистых оболочек представителями нормальной микрофлоры, компоненты ло-

вушки не способны вызвать развитие воспалительных реакций.

Примером местной иммуновоспалительной патологии, при которой НВЛ могут играть существенную роль, является хронический периодонтит. Нейтрофильные гранулоциты являются основными иммунными клетками, участвующими в воспалительном периодонтальном ответе, поэтому нарушение их функции во многом определяет прогрессирование заболевания [26].

Высказываются различные мнения о роли НВЛ в защите и/или деструкции периодонта. С одной стороны, предполагается, что образование НВЛ или их функции в тканях периодонта пациентов могут быть снижены. Это связывают с образованием гипоактивных НВЛ, а также с меньшей эффективностью их сетей для бактерий периодонта. Последнее может быть связано с действием микробных ДНКаз, а также с уклонением микробов от захвата НВЛ путем изменения заряда мембраны. Считается, что НВЛ обеспечивают высокий местный уровень концентрации АФК. Действие ДНКазы бактерий в НВЛ приводит к высвобождению АФК и протеаз, связанных с сетью, в результате чего деструкция тканей периодонта усиливается [26].

С другой стороны, заболевания периодонта могут ассоциироваться и с чрезмерным образованием НВЛ; соответственно, у таких пациентов проявляется «гиперреактивный фенотип». В подобных случаях нейтрофилы активно продуцируют НВЛ в ответ на периодонтальные бактерии и увеличение концентрации местных провоспалительных медиаторов [73, 74].

Это положение подтверждается усиленным формированием ловушек при болезнях периодонта под действием АФК [74] и интерферонов I типа (в первую очередь – лейкоцитарного и фибробластного) [75].

Чрезмерное образование сетей ДНК, содержащих медиаторы воспаления, может вызвать локальные аутоиммунные реакции с повреждением тканей [76]. Гипотеза гиперактивности НВЛ при периодонтитах разделяется, некоторыми авторами [52]. Данным авторам удалось обнаружить и визуализировать активные НВЛ в гнойных экссудатах десны пациентов с хроническим периодонтитом. Следует отметить, что электронно-микроскопический анализ биоптатов десневых карманов у пациентов с хроническим периодонтитом также подтвердил наличие ДНК-сетей.

Кроме того, оказалось, что структуры, содержащие НВЛ-сети, присутствуют в тканях десны в местах воспаления в отличие от нормальных участков десневого эпителия. Предполагается также, что деграция НВЛ периодонтальными инфекционными агентами изменяет свойства ловушек. При этом процесс завершается не иммобилизацией бактерий, а иммобилизацией и локальной фиксацией нейтрофилов, что ведет к деструкции периодонтальной ткани [52].

Из вышеприведенных данных явно следует, что НВЛ активно вовлекаются в развитие хронических (и, вероятно – острых) периодонтитов, однако они выявляются не во всех случаях и не у всех пациентов с заболеваниями периодонта. Во многом это зависит от типа бактерий, обитающих в десневой борозде, их факторов вирулентности, а также от активности самих ловушек.

Открытие нового иммунологического феномена НВЛ способствовало поиску способов его обнаружения. Brinkmann V. и соавт. для визуализации ловушек использовали сканирующую электронную микроскопию. Однако в общей практике этот метод трудно доступен, так как требует наличия специального оборудования и реагентов [27].

Для выявления НВЛ часто применяют различные методы микроскопии и способы окрашивания препаратов. При этом выявляют комплексы «ДНК-гистоны», гранулярные белки ловушек и т.д. Основой ловушек является ДНК, ее визуализируют высокочувствительными флюоресцентными красителями, например Sytox Green [77].

Разработанные методы позволяют оценить все морфологические формы нейтрофильных гранулоцитов, идентифицировать НВЛ от слизи, которая присутствует в мукозальных секретах, а также определить не только количество захваченных микроорганизмов неизменными нейтрофилами и НВЛ, но и эффективность их киллинга.

И.И. Долгушиным с соавт. предложен экспресс-метод определения нейтрофильных внеклеточных ловушек с использованием акридинового оранжевого. Метод позволяет быстро обнаружить структуры, возникающие после активации нейтрофила, и дать их количественную характеристику. Используя люминесцентную микроскопию, было установлено, что количество микроорганизмов, поглощенных нейтрофилом при фагоцитозе значительно уступает числу бактерий, задерживаемых в ловушках [78, 79].

Все вышеприведенные исследования позволяют заключить, что нейтрофильные внеклеточные ловушки представляют собой один из базовых механизмов противoinфекционной защиты, биологическая функция которого не менее важна, чем фагоцитоз и секреция медиаторов нейтрофилами.

В зависимости от природы возбуждающего агента, активированный нейтрофил решает эффекторные задачи либо с помощью фагоцитоза, либо путем секреции биологически активных веществ и ДНК с образованием НВЛ [2].

При этом внеклеточный механизм фиксации и уничтожения микроорганизмов является не только альтернативой фагоцитозу, но и в ряде случаев – более эффективной функцией нейтрофилов.

Литература

1. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Современные подходы к оценке основных этапов фагоцитарного процесса. Иммунология. 1995; 4:3-8.
2. Долгушин И.И., Бухарин О.В. Нейтрофилы и гомеостаз. Екатеринбург: Изд-во УрОРАН. 2001. 256.
3. Пинегин Б.В., Маянский А.Н. Нейтрофилы: структура и функция. Иммунология. 2007; 28: 6: 374-382.
4. Virchow R. Die Role der Gefasse und des Parenchyms in der Entzundung. Arch. Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med. 1897; 149: 381-404.
5. Pabst M.J., Hellewell P.G., Williams T.J. Priming of neutrophils Immunopharmacology of neutrophils. London: Academic. Press. 1994; 195-221.
6. Фрейдлин И.С. Иммунная система и ее дефекты. Руководство для врачей: С-Петербург: НТФФ «Полисан»; 1998: 111.
7. Faurschou M., Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. Microbes and Infection 2003; 5(14): 1317-1327.
8. Borregaard N., Cowland J. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. Blood 1997; 89(10): 3503-3521.
9. Lichtenstein A. Mechanism of mammalian cell lysis mediated by peptide defensins. Evidence for an initial alteration of the plasma membrane. The Journal of Clinical Investigation 1991; 88(1): 93-100.
10. Gera J. F., Lichtenstein A. Human Neutrophil Peptide Defensins Induce Single Strand DNA Breaks in Target Cells. Cellular Immunology 1991; 138(1): 108-120.
11. Ковальчук Л.В., Хараева З.Ф. Роль оксида азота в иммунопатогенезе стафилококковых инфекций. Иммунология 2003; 3: 186-189.

12. Семенов Б.Ф., Зверев В.В. Концепция создания быстрой иммунологической защиты от патогенов. Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии 2007; 4: 93-100.
13. Garcia-Garcia E. Molecular Mechanisms of Phagocytosis. Georgetown, Texas, Landes Bioscience 2005.
14. Hoffmann J.A. The immune response of Drosophila. Nature 2003; 426: P.33-38.
15. Takei H., Araki A., Watanabe H., Ichinose A., Sento F. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. J. Leukoc. Biol 1996; 59:229-240.
16. Klebanoff S.J. Oxygen metabolites from phagocytes. In J.I. Gallin and R. Snyderman, editors. Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 1999; 721-768.
17. Klebanoff S.J. Oxygen-dependent cytotoxic mechanisms of phagocytes. Adv. Host Defense Mech. 1982; 1: 1-11.
18. Worman H.J., Yuan J., Blobel G., Georgatos S.D. A lamin B receptor in the nuclear envelope. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988; 85:8531-8534.
19. Robinson J. M. Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes. Histochemistry and Cell Biology 2008;130(2): 281-297.
20. Hampton M.B., Kettle A.J., Winterbourn C.C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. Blood 1998; 92:3007-3017.
21. Ahluwalia J., Tinker A., Clapp L. H., et al. The large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel is essential for innate immunity. Nature 2004; 427(6977): 853-858.
22. Маянский А. Н., Маянская И. В. Реактивность и медиаторные функции интестинальных эпителиоцитов в системе мукозального гомеостаза. Иммунология. М.: Медицина 2004; 25(3): 185-192.
23. Артамонов И.Д., Григорьев И.В., Уланова Е.А. Белковый состав смешанной слюны человека: механизмы психофизиологической регуляции: Обзор [Текст]. Вестник Российской Академии медицинских наук : Ежемесячный научно-теоретический журнал 2004; 7: 36-47
24. Watson R. W. G., Redmond H. P., Wang J. H., Condron C., Bouchier-Hayes D. Neutrophils undergo apoptosis following ingestion of Escherichia coli. Journal of Immunology 1996; 156(10): 3986-3992.
25. Kobayashi S. D., Braughton K. R., Whitney A. R., et al. Bacterial pathogens modulate an apoptosis differentiation program in human neutrophils. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2003; 100(19): 10948-10953.
26. Palmer L. J. Neutrophil extracellular traps in periodontitis. A thesis submitted to The University of Birmingham for the degree of doctor of philosophy 2010; 307.
27. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science 2004; 303: 1532-1535.
28. Brinkmann V., Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to, make NETs. Nature Rev. 2007; 5: 577-582.
29. Kockritz-Blickwede V., M. Goldmann O., Thulin P. et al. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. Blood. 2008;111:3070-3080.
30. Busch H. Methods in Cancer Research New York, Academic Press 1971.
31. Takei H., Araki A., Watanabe H., Ichinose A., Sento F. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. Journal of Leukocyte Biology 1996;59(2): 229-240.
32. Lippolis J. D., Reinhardt T. A., Goff and J. P., Horst R. L. Neutrophil extracellular trap formation by bovine neutrophils is not inhibited by milk. Veterinary Immunology and Immunopathology 2006; 113(1-2): 248-255.
33. Fuchs T.A., Abed U., Goosmann C. et al. Novel cells death program leads to neutrophil extracellular traps. J. Cell Biol. 2007; 176(2):231-241.
34. Yousefi S., Gold J. A., Andina N., Lee J. J. et al. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. Nature Medicine 2008; 14(9): 949-953.
35. Fuchs H. J., Borowitz D. S., Christiansen D. H. et al. Effect of Aerosolized Recombinant Human Dnase on Exacerbations of Respiratory Symptoms and on Pulmonary-Function in Patients with Cystic-Fibrosis. New England Journal of Medicine 1994; 331(10): 637-642.
36. Wartha F, Henriques Normark B. ETosis: a novel cell death pathway. Science Signal 2008; May 27;1(21):25.
37. Neeli L., Khan S.N., Radic M. Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils. The Journal of Immunology 2008;180:1895-1902
38. Lee W. L., Grinstein S. The tangled webs that neutrophils weave. Science 2004; 303(5663): 1477-1478.
39. Gupta A.K., Hasler P., Holzgreve W., Gebhardt S., Hahn S. Induction of neutrophil extracellular DNA lattices by placental microparticles and IL-8 and their presence in preeclampsia. Hum. Immunol. 2005; 66(1): 146-1154.
40. Steinberg BE, Grinstein S. Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death. Sci STKE. 2007 Mar 27; (379):11.
41. Kessenbrock K., Krumbholz M., Schonermarck U. et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. Nature Medicine 2009;15(6): 623-625.
42. Lande R., Gregorio J., Facchinetti V. et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. Nature 200; 449(7162): 564-569.
43. Oehmcke S., Morgelin M., Herwald H. Activation of the Human Contact System on Neutrophil Extracellular Traps. J. Innate Immun. 2009; 1:225-230
44. Белоцкий С. М., Филюкова О. Б., Пашутин С. Б. Хемилюминесценция нейтрофилов человека под действием условно-патогенных микробов. Журн. микробиол 1986; 3: 89-92.
45. Мазуров Д.В., Дамбаева С.В., Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Полиоксидоний – препарат нового поколения иммуномодуляторов с известной структурой и механизмом действия. Иммунология 2000; 5: 24-28.
46. Clark S.R., Ma A.C., Tavenor S.A. et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. Nat Med. 2007; 13(4):463-469.
47. Swarup V., Rajeswari MR. Circulating (cell-free) nucleic acids—a promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases. Department of Biochemistry, All India Institute of Medical Sciences 2007; Mar 6;581(5):795-9.
48. Margraf S., Lugters T., Reipen J., Altrichter J., Scholz M., Windolf J. Neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA-NETs): A potential prognostic marker for posttraumatic development of inflammatory second hit and sepsis shock. 2008; 30(4): 352-358.
49. Logters T., Margraf S., Altrichter J. The clinical value of neutrophil extracellular traps. Med Microbiol Immunol 2009; 198:211-219.
50. Zhong X.-Y., Mthlennen I. von, Li Y. et al. Increased Concentrations of Antibody-Bound Circulatory Cell-Free DNA in Rheumatoid Arthritis. Clinical Chemistry 2007; 53(9):1609-1614.
51. Baker V., Imade G., Molta N. et al. Cytokine-associated neutrophil extracellular traps and antinuclear antibodies in

- Plasmodium falciparum infected children under six years of age. *Malaria Journal* 2008;7(1): 41.
52. Vitkov L., Klappacher M., Hannig M., Krautgartner W. D. Extracellular neutrophil traps in periodontitis. *Journal of Periodontal Research* 2009; 44(5): 664-672.
53. Bianchi M., Rahmathullah A. H., Brinkmann V., Siler U., Seger R. A., Zychlinsky A. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillois. *Blood* 2009;114(13): 2619-2622.
54. Guimaraes-Costa A. B., Nascimento M. T. C., Froment G. S., et al. Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *PNAS* 2009;106(16): 6748-6753.
55. Ramos-Kichik V., Mondragyn-Flores R., Mondragyn-Castel6n M. et al. Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 2009;89(1): 29-37.
56. Alghamdi A. S., Foster D. N. Seminal DNase Frees Spermatozoa Entangled in Neutrophil Extracellular Traps. *Biology of Reproduction* 2005;73(6): 1174-1181.
57. Buchanan J. T., Simpson A. J., Aziz R. K. et al. DNase Expression Allows the Pathogen Group A Streptococcus to Escape Killing in Neutrophil Extracellular Traps. *Current Biology* 2006;16(4): 396-400.
58. Reid S D., Hong W., Dew K E. et al. Streptococcus pneumoniae forms surface-attached communities in the middle ear of experimentally infected chinchillas. *The Journal of Infectious Diseases* 2009;199(6): 786-794.
59. Hong W. Z., Juneau R. A., Pang B., Swords W. E. Survival of Bacterial Biofilms within Neutrophil Extracellular Traps Promotes Nontypeable Haemophilus influenzae Persistence in the Chinchilla Model for Otitis Media. *Journal of Innate Immunity* 2009;1(3): 215-224.
60. Wardini A.B., Guimaraes-Costa A.B., Nascimento M. et al. Characterization of neutrophil extracellular traps in cats naturally infected with feline leukemia virus. *J. Gen Virol* 2010; 91:259-264.
61. Behrendt J. H., Ruiz A., Zahner H., Taubert A., Hermosilla C. Neutrophil extracellular trap formation as innate immune reactions against the apicomplexan parasite *Eimeria bovis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2010;133(1): 1-8.
62. Wang Y., Li M., Stadler S. et al. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *The Journal of Cell Biology* 2009;184(2) :205-213.
63. Gupta AK., Joshi MB., Philippova M. et al. Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. *FEBS Lett.* 2010;584:3193-3197.
64. Hakkim A., Furnrohr B.G., Amann K. et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:9813-9818.
65. Lande R., Ganguly D., Facchinetti V. et al. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med.* 2011;3:73ra19.
66. Falk R. J., Terrell R. S., Charles L. A., Jennette J. C. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1990; 87(11): 4115-4119.
67. Holdenrieder S., Eichhorn P., Beuers U. et al. Nucleosomal DNA Fragments in Autoimmune Diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006;1075: 318-327.
68. Долгушин И.И., Андреева Ю.С. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: метод обнаружения и оценка эффективности улавливания бактерий *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 2009; 2: 65-67.
69. Мезенцева Е.А., Андреева Ю.С., Долгушин И.И. и др. Влияние непатогенных и условно-патогенных представителей нормофлоры слизистых оболочек на секрецию нейтрофилами антимикробных продуктов и цитокинов. *Вестник новых медицинских технологий* 2009; (XVI) 2: 16 – 17.
70. Кононов А.В. Местный иммунный ответ на инфекцию *Helicobacter pylori*. *Рос.журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол* 1999; 2:15-21.
71. Смольникова Л.А., Долгушина В.Ф., Долгушин И.И. Состояние факторов местной иммунной защиты репродуктивного тракта при вагинозе у беременных. *Журн микробиол эпидемиол и иммунобиол* 2001; 4: 89-93.
72. Новиков А. И., Кононов А. В., Ваганова И. Г. Инфекции, передаваемые половым путем, и экзoцервикс. М., 2002.
73. Рыжкова А.И., Шишкова Ю.С., Савочкина А.Ю. Образование нейтрофильных внеклеточных ловушек в чистой фракции нейтрофилов и в цельной крови под влиянием грибов рода *Candida*. *Материалы VII итоговой науч.-практ. конф. молодых ученых ЧелГМА. Челябинск* 2009: 117 – 120.
74. Matthews J. B., Wright H. J., Roberts A., Cooper P. R. Chapple I. L. C. Hyperactivity and reactivity of peripheral blood neutrophils in chronic periodontitis. *Clinical and Experimental Immunology* 2007;147(2): 255-264.
75. Matthews J. B., Wright H. J., Roberts A., Ling-Mountford N., Cooper P. R., Chapple I. L. C. Neutrophil Hyperresponsiveness in Periodontitis. *Journal of Dental Research* 2007; 86(8): 718-722.
76. Wright H. J., Matthews J. B., Chapple I. L. C., Ling-Mountford N., Cooper P. R. Periodontitis Associates with a Type 1 IFN Signature in Peripheral Blood Neutrophils. *Journal of Immunology* 2008; 181(8): 5775-5784.
77. Mayadas T. N., Tsokos G. C., Tsuboi N. Mechanisms of Immune Complex-Mediated Neutrophil Recruitment and Tissue Injury. *Circulation* 2009;120(20): 2012-2024.
78. Grinberg N., Elazar S., Rosenshine I., Shpigel N. Y. beta-hydroxybutyrate abrogates formation of bovine neutrophil extracellular traps and bactericidal activity against mammary pathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 2008;76(6): 2802-2807.
79. Долгушин И.И., Андреева Ю.С. Способ обнаружения НВЛ: патент РФ на изобретение. № 2384844 от 0.04.2008

Сведения об авторах

Коротина Ольга Львовна – аспирант кафедры клинической микробиологии ВГМУ; 210023, г.Витебск, пр.Фрунзе, 27, scidep@mail. ru, 8-0212-37-06-12
Генералов Игорь Иванович – зав. кафедрой клинической микробиологии ВГМУ, д-р. мед. наук, профессор; 210023, г.Витебск, пр.Фрунзе, 27, scidep@mail.ru, 8-0212-37-06-12

Поступила 18.10.2012 г.