

А.Л.Кравцов

ФОРМИРОВАНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК – ЭФФЕКТИВНЫЙ МЕХАНИЗМ ЗАЩИТЫ ОРГАНИЗМА ОТ ПАТОГЕНА*ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов*

В обзоре обобщены и проанализированы современные литературные данные о способности клеток, реализующих механизмы врожденного иммунитета (нейтрофилов, эозинофилов и тучных клеток), формировать внеклеточные ловушки для захвата и киллинга патогенных микроорганизмов путем секреции ДНК и содержимого бактерицидных гранул в экстрацеллюлярное пространство. Эффективность улавливания и обезвреживания патогенов во внеклеточных ловушках выше, чем при фагоцитозе, и предполагают, что механизм внеклеточной бактерицидности играет важную роль в защите организма от бактерий, обладающих устойчивостью к лейкоцитарному фагоцитозу.

Ключевые слова: внеклеточные ловушки, врожденный иммунитет, бактериальная инфекция, секреция ДНК, секреторная дегрануляция, лейкоцитарные протеазы, антибактериальные пептиды.

A.L.Kravtsov

Formation of Extracellular Traps – the Effective Mechanism of Organism Protection from Pathogen*Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov*

Summarized and analyzed are modern literature data on capability of cells (neutrophils, eosinophils and labrocytes) realizing the mechanisms of innate immunity, to form extracellular traps that capture and kill pathogens by secretion of DNA and antibacterial granules content into extracellular space. The efficiency of capture and bacterial clearance is higher in extracellular traps than that in phagocytosis. The mechanism of extracellular bactericidal activity is supposed to play an important role in protection of organism from bacteria which are resistant to phagocytosis by leukocytes.

Key words: extracellular space, innate immunity, bacterial infection, DNA secretion, secretory degranulation, leukocyte proteases, antibacterial peptides.

Для создания быстрой неспецифической защиты организма от патогенов в последние годы предложена новая концепция разработки вакцин, в основе которой лежит принцип стимуляции функциональной активности клеток системы врожденного иммунитета [7]. Важной частью врожденного иммунного ответа является, наряду с фагоцитозом, образование сетеподобных структур (ловушек) для киллинга бактерий во внеклеточном пространстве [36, 37, 44]. Интерес исследователей к оценке врожденного иммунного ответа по данному показателю обусловлен тем обстоятельством, что примированные нейтрофилы крови иммунного (сенсibilизированного) организма отвечают на повторный контакт со специфическим антигеном более интенсивными и быстрее развивающимися дегенеративными изменениями в ядрах и цитоплазме [1, 26]. Хотя на практике это давно используется (показатель повреждения нейтрофилов – тест ППН *in vitro*) для диагностики инфекционных заболеваний (например, туберкулеза), а также для оценки напряженности приобретенного в результате вакцинации антибактериального иммунитета [8], без учета недавно установленной способности нейтрофилов формировать внеклеточные ловушки сложно объяснить, каким образом «повреждение» нейтрофилов в периферической крови или в очаге инфекционного воспаления может предотвратить распространение бактерий по всему организму [44].

Целью настоящей работы явился обзор литерату-

ры, посвященной изучению процесса формирования внеклеточных ловушек нейтрофилами, тучными клетками и эозинофилами, а также роли этих структур в защите организма хозяина от патогенных бактерий.

Нейтрофильные внеклеточные ловушки (neutrophil extracellular traps – NETs)

Нейтрофилы являются одной из самых многочисленных клеточных популяций в организме, и в крови человека доля этих клеток врожденного иммунитета составляет более 90 %. Нейтрофильные гранулоциты выполняют функцию киллинга патогенных микроорганизмов с помощью NETs и фагоцитоза, а также функцию регуляции иммунного ответа организма хозяина путем модуляции экспрессии клеточных рецепторов и активности провоспалительных цитокинов [5].

Впервые NETs были зарегистрированы с использованием электронной микроскопии в 2004 г. [14] и на рис. 1 показано, как выглядят эти структуры, формируемые активированными нейтрофилами во внеклеточном пространстве, когда они захватывают и убивают бактерии. При образовании NETs происходит деконденсация ядерного хроматина и дезинтеграция ядерной оболочки с одновременным нарушением целостности мембран лизосомальных гранул, что следует за обязательной предварительной стимуляцией в клетках «респираторного взрыва» с высвобождением реактивных форм кислорода. Активированный нейтрофил еще сохраняет свою

жизнеспособность, когда в нем происходит смешивание ядерного хроматина с содержимым бактерицидных гранул и формируется сетеподобная структура, секретируемая впоследствии во внеклеточное пространство. При высвобождении данной структуры активированный («поврежденный») нейтрофил погибает [1]. Морфологически этот процесс, названный «NETosis», отличается от других классических процессов клеточной гибели – апоптоза и некроза, прежде всего, деконденсацией хроматина и дезинтеграцией ядерной оболочки, исчезновением цитоплазматических гранул и смешиванием ядерного содержимого с материалом цитоплазмы. Молекула ДНК высвобождается из клетки без фрагментации ее эндонуклеазами. При апоптозе, наоборот, хроматин конденсируется и происходит его фрагментация без нарушения целостности ядерной оболочки. При некрозе нарушается целостность самой клетки, она лизируется, но без развития изменений в гранулах и ядерной мембране. Сетеподобная структура, состоящая из молекулы ДНК и содержимого цитоплазматических гранул, при некрозе и апоптозе не образуется [21].

Так как обработка ДНКазой приводит к разрушению NETs (рис. 2), молекула ДНК считается основным структурным элементом внеклеточных ловушек, формируемых нейтрофильными гранулоцитами. Нити ДНК в составе NETs имеют диаметр 15–17 нм, а в комплексе с локализованными на них белками – от 25 до 50 нм. Катионные белки внеклеточных ловушек (сериновые лейкоцитарные протеазы, гистоны и антибактериальные пептиды – АБП) определяют способность данных структур к эффективному киллингу патогенных бактерий [32, 44].

Важнейшим компонентом нейтрофильных ловушек считается лейкоцитарная эластаза (ЛЭ) [32], расщепляющая при дегрануляции ядерные гистоны (H1, H4) и запускающая, таким образом, процесс деконденсации хроматина активированных нейтрофи-

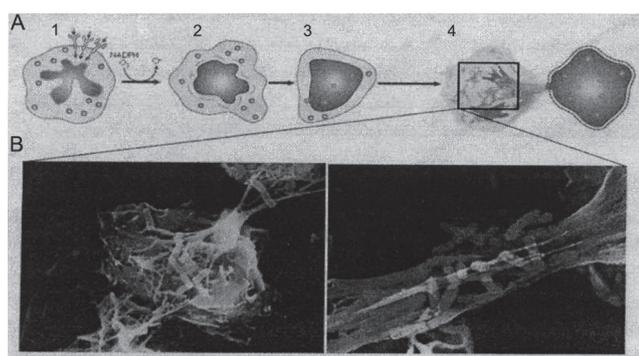


Рис. 1. А. Формирование NET активированными нейтрофилами. Активация нейтрофилов (1) приводит к «респираторному взрыву» и высвобождению реактивных форм кислорода. Нарушается целостность ядерной мембраны (2) и содержимое гранул смешивается внутри клетки с ядерным хроматином (3). Клеточная мембрана открывается и сетеподобная структура, состоящая из хроматина и бактерицидных катионных белков, высвобождается во внеклеточное пространство (4). В. Снимок с сайта Института инфекционной биологии им. Макса Планка. Слева – нейтрофил выбрасывает свою ловчую сеть наружу, а справа – участок сети, в котором запутались бактерии рода *Shigella*

лов, необходимый для формирования NETs [39]. ЛЭ является протеазой, ответственной за избирательное расщепление бактериальных факторов вирулентности [46], за деградацию микробных антигенов, обладающих провоспалительными и иммуностимулирующими свойствами [33], а также за образование АБП из лизосомальных (небактерицидных) белков предшественников [18]. Этот катионный белок играет решающую роль в обезвреживании некоторых грамотрицательных микроорганизмов (например, *Borrelia burgdorferi* [23], *Pseudomonas aeruginosa* [27], *Escherichia coli* [19]) и считается ключевым белком врожденной антибактериальной защиты [46]. За счет адсорбции на молекуле ДНК достигается высокая концентрация ЛЭ в месте внедрения инфекционного агента. С другой стороны, адсорбция предотвращает (или ослабляет) повреждающий эффект этой самой опасной лейкоцитарной протеазы на белки плазмы крови и других тканей организма хозяина [32]. Кроме ЛЭ, в состав NETs входят: миелопероксидаза, катепсин G, желатиназа, АБП, гистоны, гуморальный паттернраспознающий рецептор пентраксин 3 и белки, распознающие пептидогликан [44].

Отрицательно заряженная молекула ДНК служит также основой для адсорбции участвующих в коагуляции плазменных сериновых протеаз (факторы XI, XII и калликреин), которые вместе с высокомолекулярным кининогеном входят в контактную систему. Образование NETs активирует контактную систему,

Орицательно заряженная молекула ДНК служит также основой для адсорбции участвующих в коагуляции плазменных сериновых протеаз (факторы XI, XII и калликреин), которые вместе с высокомолекулярным кининогеном входят в контактную систему. Образование NETs активирует контактную систему,

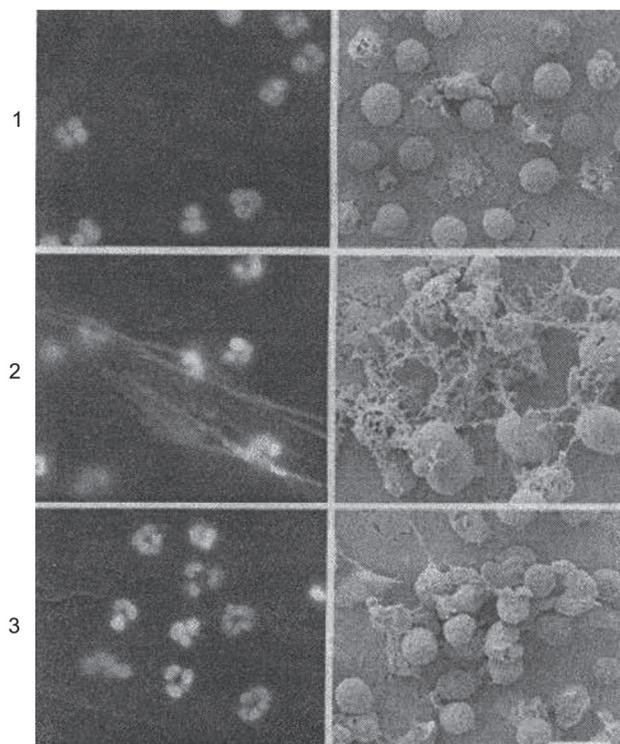


Рис. 2. Формирование NETs активированными нейтрофилами по данным световой (слева) и электронной (справа) микроскопии:

нейтрофилы до (1) и после (2) стимуляции комплексом фибриноген-белок M1 *S. pyogenes*, стимулированные нейтрофилы после обработки ДНКазой (3). Рисунок адаптирован из работы S.Oehmcke et al. [38]

что приводит к резкому повышению уровня секреции АБП и к усилению врожденного иммунного ответа [38]. Недавно полученные экспериментальные данные Т.А. Fuch *et al.* [22] наглядно иллюстрируют, что NETs – это основа для адгезии тромбоцитов и эритроцитов, ранее неизвестное связующее звено между инфекцией, воспалением и тромбозом. Важно, что NETs стимулируют внутрисосудистое свертывание крови, а препятствующий тромбообразованию гепарин предотвращает формирование NETs в образцах крови человека и животных.

Анализ литературы свидетельствует, что NETs формируют активированные нейтрофилы крови как человека [38], так и различных видов животных [14, 20, 44]. Запускать этот процесс могут различные провоспалительные стимулы, включая перекись водорода (H_2O_2), бактериальный липополисахарид (ЛПС), митоген форболмирилатацетат (ФМА) и хемокин интерлейкин-8 (ИЛ-8) (таблица). Стимулировать процесс образования NETs может также продукт расщепления 5-го компонента комплемента во время его активации в сыворотке крови (C5a), но только после примирования зрелых нейтрофилов интерферонами или фактором, стимулирующим образование колоний гранулоцитов и макрофагов (ГМ-КСФ) [35].

Сравнительные исследования, проведенные российскими учеными, показали, что эффективность захвата и киллинга бактерий NET структурами выше, чем при фагоцитозе. От данного механизма киллинга бактерий во многом зависит антибактериальная защита слизистых оболочек [1] и эффективность реализации нейтрофилами своего мощного бактерицидного потенциала в крови, обсемененной патогенными бактериями [26]. При бактериемии ЛПС активирует тромбоциты через TLR-4 (Toll-like receptor 4) типа на клеточной поверхности, что приводит к секреции этими клетками цитокинов. Цитокины индуцируют формирование стимулированными нейтрофилами NETs, которые захватывают и убивают бактерии в кровеносных сосудах [17, 34]. На добавление ЛПС чумного микроба в цельную кровь человека нейтрофилы уже через 30 мин отвечают, по данным проточной цитофлуориметрии, интенсивной азурофильной дегрануляцией [4] и, возможно, формируют внеклеточные ловушки, подобно тому, как это происходит в ответ на препарат «пирогенал» (ЛПС *P. aeruginosa*) при 30-минутной экспозиции в условиях *in vitro* [9]. Для запуска образования NETs может быть достаточен контакт с другими очищенными антигенами патогенных бактерий, например такими, как белок M1 *Streptococcus pyogenes* [31, 38] или поверхностный липофосфогликан *Leishmania amazonensis* [24]. Однако взаимодействие нейтрофилов с различными живыми микроорганизмами (таблица) оказывает более выраженный эффект на процесс образования NETs [14, 21]. Особо активны представители нормальной микрофлоры (*Bifidobacterium spp.*, *Lactobacterium spp.*), которые обитают в организме человека, постоянно активируют клетки врожденного иммунитета и, возможно, именно поэтому не проявляют свои патогенные свойства [1].

Время, необходимое для формирования NETs, составляет в зависимости от стимула от 10 мин до 4 ч [44].

На примере клеток *Staphylococcus aureus* в условиях *in vitro* было установлено, что нестимулированные (наивные) нейтрофилы обезвреживают бактерии сначала с помощью фагоцитоза, а затем путем образования NETs. Однако если нейтрофилы стимулировать ФМА или ЛПС, запустив процесс формирования NETs, то киллинг бактерий за счет фагоцитоза будет минимальным и они будут погибать в основном во внеклеточных ловушках. Спустя 3–4 ч после стимуляции, когда процесс образования ловушек завершается, киллерная активность нейтрофильных гранулоцитов по отношению к золотистому стафилококку на 100 % связана с функционированием NETs [21]. По нашим данным, гранулоциты цельной крови привитых против чумы людей отвечают *in vitro* на клетки чумного микроба, выращенные при 28 °С, более интенсивной секреторной дегрануляцией.

Факторы или микроорганизмы, вызывающие формирование внеклеточных ловушек

Фактор или микроорганизм	Тип клеток формирующих ловушки	Источник литературы
Интерлейкин –8 (ИЛ-8)	Нейтрофилы	[14]
Липополисахарид (ЛПС)	Нейтрофилы	[14]
Форболмирилатацетат (ФМА)	Нейтрофилы, тучные клетки	[14, 21, 43]
Перекись водорода	Нейтрофилы, тучные клетки	[21, 43]
Тромбоциты крови, активированные ЛПС через TLR4	Нейтрофилы	[17, 26, 34]
Интерферон (ИФН) γ + C5a	Нейтрофилы, эозинофилы	[35, 48]
Интерферон (ИФН) γ + ЛПС	Эозинофилы	[48]
Интерферон (ИФН) γ + эотаксин	Эозинофилы	[48]
ИЛ-5+ЛПС/C5a/эотаксин	Эозинофилы	[48]
Интерферон (ИФН) α + C5a	Нейтрофилы	[35]
ГМ-КСФ + C5a	Нейтрофилы	[35]
<i>Staphylococcus aureus</i>	Нейтрофилы, тучные клетки	[1, 14, 21, 43]
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Нейтрофилы, тучные клетки	[15, 38, 43]
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Нейтрофилы	[45]
Белок M1 <i>Streptococcus pyogenes</i> + фибриноген	Нейтрофилы, тучные клетки	[31, 38]
<i>Bifidobacterium spp.</i> и <i>Lactobacterium spp.</i>	Нейтрофилы	[1]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Тучные клетки	[43]
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Нейтрофилы	[40]
<i>Candida albicans</i>	Нейтрофилы	[42]
<i>Escherichia coli</i>	Нейтрофилы	[1]
<i>Salmonella enterica</i>	Нейтрофилы	[14]
<i>Shigella flexneri</i>	Нейтрофилы	[14]
<i>Plasmodium falciparum</i>	Нейтрофилы	[11]
<i>Listeria monocytogenes</i>	Нейтрофилы	[14]
<i>Aspergillus nidulans</i>	Нейтрофилы	[12]
<i>Leishmania amazonensis</i>	Нейтрофилы	[24]
Липофосфогликан <i>L. amazonensis</i>	Нейтрофилы	[24]

Противочумная вакцинация активизирует врожденный иммунный ответ на клетки чумного микроба, вероятно, путем стимуляции процесса формирования NETs [6]. Необходимы дальнейшие исследования в данном направлении с целью создания экспериментально-методической основы для оценки у людей напряженности приобретенного противочумного иммунитета.

Контроль за дегенеративными изменениями в ядерном хроматине и гранулах нейтрофилов можно осуществлять с помощью микроскопии [1, 26, 38], либо методом импульсной проточной цитофлуориметрии [4, 6, 29-30]. Разработанные в России оригинальные методы оценки содержания и антимикробной активности NETs в периферической крови и мукозальных секретах применяются на практике для определения эффективности иммунотропных препаратов и мукозальных вакцин [1].

Внеклеточные ловушки тучных клеток (Mast cell extracellular traps – MCETs) и эозинофильные внеклеточные ловушки (eosinophil extracellular traps – EETs)

На начальном этапе исследований считалось, что внеклеточные ловушки формируют только нейтрофилы. Однако в дальнейшем было установлено, что тучные клетки (ТК) также способны секретировать свою ядерную ДНК для образования внеклеточных ловушек. В связи с распространением данного феномена на другие клетки термины «NET и NETosis» было предложено заменить на «ЕТ и ETosis» [44].

ТК встречаются в коже, дыхательных путях, желудочно-кишечном тракте, а также в органах мочеполовой, эндокринной и нервной систем, где локализуются преимущественно вдоль кровеносных, лимфатических сосудов и нервных окончаний, в непосредственной близости к границе внешней и внутренней среды организма [10]. Они имеют общность происхождения с лейкоцитами и содержат в цитоплазматических гранулах мощный арсенал бактерицидных веществ, принимающих участие в антибактериальной защите [13]. Однако более распространено представление о ТК как эффекторах аллергических реакций или одноклеточных эндокринных желез, способных продуцировать различные классы биологически активных веществ (биогенные амины, пептидные гормоны, эйкозаноиды, цитокины, хемокины и др.). Механизмы киллинга бактерий ТК еще недостаточно изучены, но в последние годы отмечается повышенный интерес исследователей к их выяснению [10] и, в частности, формированию MCETs [44].

Способность ТК человека и мышей к секреции ядерной ДНК и формированию MCETs впервые была установлена в 2008 г. M. von Kockritz-Blickwede *et al.* [43] с помощью люминесцентной и сканирующей электронной микроскопии. В настоящее время такая способность зарегистрирована в опытах с различными патогенными микроорганизмами (таблица), включая *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. pyogenes* [43], и, подобно формированию NETs, в ответ на белок M1 *S. pyogenes* [31]. Ключевыми компонентами MCETs являются молекула ДНК и гистоны ядерного хро-

матина, но по составу бактерицидных веществ эти структуры имеют принципиальное отличие от NETs. Вместо эластазы, миелопероксидазы и катепсин G, они содержат специфическую протеазу ТК триптазу и специфический АБП LL-37 [44]. В отличие от NETs, MCETs нельзя инактивировать только путем обработки их ДНКазой и требуется дополнительная обработка миелопероксидазой для деградации триптазы [43]. Механизм гибели ТК при формировании ловушек такой же, как и при образовании NETs, и также занимает по времени от 10 мин до 4 ч [44].

Эозинофилы демонстрируют сходные с нейтрофилами феномены созревания, за исключением того, что, видимо, у них формируется только один тип гранул. Эти клетки имеют обыкновение появляться в местах локализации чужеродных белков и паразитов, а также при аллергических реакциях. Однако роль эозинофилов в иммунитете, их точная функция (и) в защите организма от патогенных бактерий остается неясной [3]. Поэтому важным достижением в изучении механизмов врожденной антибактериальной защиты явилось установление факта катапультаподобного выброса (catapult-like ejection) эозинофилами митохондриальной ДНК для обезвреживания патогенных микроорганизмов [48]. Этот процесс занимает по времени не часы и минуты, а секунды. Подобно NETs, обработка EETs ДНКазой приводит к их разрушению и, как следствие, к неспособности функционирования механизма внеклеточной бактерицидности эозинофильных гранулоцитов [44]. За счет выброса содержимого своих гранул на поверхность паразитов, эозинофилы обнаруживают исключительную способность к их повреждению и уничтожению [3].

Формирование ETs при различных заболеваниях. Механизмы, используемые микробами для предотвращения захвата и бактерицидного эффекта ETs

Механизм внеклеточной бактерицидности, лежащий в основе нефагоцитарного типа тканевой резистентности [2], играет важную роль в киллинге грамположительных и грамотрицательных бактерий, микобактерий, грибов и паразитов (таблица), но вопрос о способности ETs захватывать и убивать вирусы остается открытым [36, 44]. Иерсинии, сальмонеллы и другие факультативные внутриклеточные паразиты в результате частичного (или полного) обезвреживания продуктами секреции нейтрофилов быстро подвергаются завершеному фагоцитозу макрофагами. Они утрачивают способность к размножению в макрофагах [2, 41].

Имеются сообщения о формировании ETs в условиях *in vivo* при различных заболеваниях, включая аппендицит [14], бактериальный вагиноз [1], малярию [11], кожный лейшманиоз [24], экспериментальную дизентерию [14], отиты [28], системную красную волчанку [25], пневмонию [37, 45] и инвазивный бронхолегочный аспергиллез [12]. Неспособность клеток врожденного иммунитета формировать ETs приводит к сепсису и другим инфекционным осложнениям, что, в частности, характерно для всех ново-

рожденных, обладающих в сравнении со взрослыми повышенной чувствительностью к инфекционным заболеваниям, вызываемым условно-патогенной микрофлорой [47]. При нарушении регуляции формирования и удаления ETs образуются аутоантитела к ДНК, гистонам, эластазе и другим белкам нейтрофилов крови [25], но роль ETs при аутоиммунных заболеваниях до конца неясна и в настоящее время является объектом изучения [11, 25, 32, 44].

Несколькими независимыми группами исследователей было установлено, что патогенные бактерии могут использовать для распространения в организме хозяина процесс разрушения ETs нуклеазами. Штаммы *S. pyogenes*, лишенные продукции кодируемой бактериофагом ДНКазы Sda1, обладали повышенной чувствительностью к киллингу NETs и пониженной степенью вирулентности, в то время как гетерологичная экспрессия Sda1 у других бактериальных штаммов приводила к неспособности нейтрофилов убивать микробные клетки вследствие разрушения NETs нуклеазой [15]. Приобретением кодируемой бактериофагом ДНКазы Sda1 и генетическим «переключением» на инвазивный фенотип по данному показателю объясняют причину быстрого распространения гипервирулентного клона M1 серотипа *S. pyogenes* по всему организму и развития различных инфекций кожи и мягких тканей, включая некротизирующие фасциты [15, 44]. Поверхностный белок M1, являющийся фактором вирулентности *S. pyogenes*, связывает АБП, что приводит к неспособности NETs и MCETs убивать стрептококки [31]. Установлена способность ДНКазы EndA *S. pneumoniae* разрушать NETs, что определяет устойчивость этого вида бактерий к киллингу нейтрофилами и, как следствие, их повышенную вирулентность при изучении на модели экспериментальной пневмонии мышей [20, 44].

От бактерицидного эффекта NETs микробную популяцию защищает образование биопленок [28]. Кроме того, чтобы защитить свои структурные белки и факторы вирулентности от разрушительного действия ЛЭ, патогенные бактерии продуцируют специальный ингибитор (экотин), специфически подавляющий активность этой сериновой трипсиноподобной протеазы. Мутанты, лишенные продукции экотина, обладают сниженной вирулентностью и их скорость размножения в условиях *in vivo* в сотни раз ниже, чем диких штаммов. Причем, это характерно для бактерий, патогенных для людей и животных (*Yersinia pestis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* и др.), но не для растений [19]. *Y. pestis* как возбудитель самой эпидемически опасной бактериальной инфекции (первично-легочной форму чумы) в 2 раза больше влияет на уровень экспрессии другого специфического ингибитора ЛЭ (Neutrophil/Monocyte Elastase Inhibitor или N/M EI) в лейкоцитах крови человека, чем близкородственный возбудитель псевдотуберкулеза. На возбудитель кишечного иерсиниоза в аналогичных экспериментальных условиях реакция по данному показателю отсутствовала. Хотя с помощью протеомики была изучена экспрессия 12 различных

лейкоцитарных белков, участвующих в регуляции иммунного ответа организма хозяина, особой реакции на чумные микробы не зарегистрировано ни по какому другому показателю [16].

По данным проточной цитофлуориметрии, живые чумные микробы, выращенные с аэрацией на жидкой питательной среде с температурой 37 °С (экспоненциальная культура), совсем не вызывают, попадая в цельную кровь человека, дегенеративные изменения в ядерном хроматине и бактерицидных гранулах клеток врожденного иммунитета в течение первых 6–8 ч инкубации крови при 37 °С. Поскольку такие изменения неизменно развиваются к 4 ч в ответ на клетки золотистого стафилококка и чумные микробы, выращенные при 28 °С [29, 30], можно предположить, что у возбудителя чумы имеется эффективный, но еще неизученный механизм подавления в крови человека процесса формирования NETs, связанный с изменением фенотипа при повышении температуры от 28 до 37 °С. Если это так, то для обезвреживания чумного микроба, вероятно, необходимо запустить процесс формирования внеклеточных ловушек, активировав клетки врожденного иммунитета пробиотиками или каким-либо другим иммуностимулирующим препаратом (ЛПС, белком M1 *S. pyogenes* и т.д.).

Таким образом, в антибактериальной защите важную роль играет, наряду с фагоцитозом, механизм внеклеточной бактерицидности нейтрофилов, эозинофилов, тучных клеток и, возможно, других клеток, участвующих в реализации механизмов врожденного иммунитета. На современном этапе развития науки наблюдается тенденция к переходу от изучения внутриклеточных, к исследованию еще недостаточно изученных внеклеточных механизмов бактерицидности. Необходимы исследования, направленные на изучение процесса формирования NETs в крови человека и животных под влиянием штаммов возбудителей особо опасных инфекций (чумы, сибирской язвы, холеры, туляремии и др.) с различными фенотипическими и генотипическими свойствами. Результаты изучения процесса формирования внеклеточных ловушек под влиянием возбудителей особо опасных инфекций и их антигенов могут представлять интерес как в аспекте дальнейшего изучения взаимодействия макро- и микроорганизма, так и с точки зрения характеристики эффективности вакцин по степени их активирующего воздействия на секреторную функцию гранулоцитов крови людей и животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Долгушин И.И., Андреева Ю.С., Савочкина А.Ю. Нейтрофильные внеклеточные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов. М.: Изд-во РАМН; 2009. 208 с.
2. Исачкова Л.М., Плехова Н.Г. К развитию представлений об антиинфекционной резистентности. Эпидемиол. и инф. бол. 2002; 1:11–5.
3. Козинец Г.И., Высоцкий В.В., Погорелов В.М. и др. Кровь и инфекция. М.: Триада-Фарм; 2001. 456 с.
4. Кравцов А.Л., Гребенюкова Т.П., Тараненко Т.М., Кузнецов О.С., Храмченкова Т.А., Наумов А.В. Проточнocyтoфлуориметрический мониторинг за развитием азурофильной дегрануляции нейтрофилов в цельной крови человека в

ответ на эндотоксин *Yersinia pestis*. Пробл. особо опасных инф. 1999; 79:81–9.

5. Кравицов А.Л., Шмелькова Т.П. Секреторная дегрануляция нейтрофилов как триггер воспаления и регулятор иммунного ответа: роль сериновых лейкоцитарных протеаз и протеолитически активируемых рецепторов. Эпидемиол. и вакцинопрофилактика. 2011; 1(56):79–87.

6. Кравицов А.Л., Шмелькова Т.П., Шуковская Т.Н. Влияние противочумной вакцинации на функциональную активность клеток врожденного иммунитета человека. Пробл. особо опасных инф. 2011; 1(107):77–80.

7. Семенов Б.Ф., Зверев В.В. Концепция создания быстрой иммунологической защиты от патогенов. Журн. эпидемиол. микробиол. и иммунобиол. 2007; 4:93–100.

8. Фрадкин В.А. Диагностика аллергии реакциями нейтрофилов крови. М.: Медицина; 1985. 176 с.

9. Шишкова Ю.С., Савочкина А.Ю., Рыжкова А.И., Мезентева Е.А. Влияние препарата «пирогенал» на образование нейтрофильных внеклеточных ловушек. Мед. наука и образование Урала. 2009; 10(3):23–4.

10. Яглова Н.В. Тучные клетки и врожденный иммунитет. Иммунология. 2009; 2:139–42.

11. Baker V.S., Imade G.E., Molta N.B. et al. Cytokine-associated neutrophil extracellular traps and antinuclear antibodies in *Plasmodium falciparum* infected children under six years of age. Malar. J. 2008; 7:41.

12. Bianchi M., Hakkim A., Brinkmann V. et al. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. Blood. 2009; 114(13):2619–22.

13. Bischoff S.C., Kamer S. Human mast cells, bacteria, and intestinal immunity. Immunol. Rev. 2007; 217:329–37.

14. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science. 2004; 303:1532–5.

15. 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. Curr. Biol. 2006; 16:396–400.

16. Chromy B.A., Perkins J., Heidbrink J.L. et al. Proteomic characterization of host response to *Yersinia pestis* and near neighbors. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004; 320:474–9.

17. Clark S.R., Ma A.C., Tavener S.A. et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. Nat. Med. 2007; 13:463–9.

18. Cole A.M., Shi J., Ceccarelli A. et al. Inhibition of neutrophil elastase prevents cathelicidin activation and impairs clearance of bacteria from wounds. Blood. 2001; 97(1):297–304.

19. Eggers C.T., Murray I.A., Delmar V.A. et al. The periplasmic serine protease inhibitor ecotin protects bacteria against neutrophil elastase. Biochem. J. 2004; 379 (Pt 1):107–18.

20. Ermert D., Urban C.F., Laube B. et al. Mouse neutrophil extracellular traps in microbial infections. J. Innate Immun. 2009; 1:181–93.

21. Fuchs T.A., Abed U., Goosmann C. et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. J. Cell Biol. 2007; 176:231–41.

22. Fuchs T.A., Brill A., Duerschmied D. et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2010; 107(36):15880–5.

23. Garcia R., Gusmani L., Murgia R. et al. Elastase is the only human neutrophil granule protein that alone is responsible for *in vitro* killing of *Borrelia burgdorferi*. Infect. Immunity. 1998; 66(4):1408–12.

24. Guimaraes-Costa A.B., Nascimento M.T., Froment G.S. et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2009; 106:6748–53.

25. Hakkim A., Furnrohr B.G., Amann K. et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2010; 107(21):9813–8.

26. Hickey M.J., Kubes P. Intravascular immunity: the host-pathogen encounter in blood vessels. Nature Rev. Immunology. 2009; 9:364–74.

27. Hirche T.O., Benabid R., Delslee G. et al. Neutrophil elastase mediates innate host protection against *Pseudomonas aeruginosa*. J. Immunology. 2008; 181:4945–54.

28. Hong W., Juneau R.A., Pang B., Swords W.E. Survival bacterial biofilms within neutrophil extracellular traps promotes non-typeable *Haemophilus influenzae* persistence in the chinchilla model otitis media. J. Innate Immun. 2009; 1:215–24.

29. Kravtsov A.L., Grebenyukova T.P., Bobyleva E.V. et al. Flow cytometric assay of human whole blood leukocyte DNA degradation in response to *Yersinia pestis* and *Staphylococcus aureus*. Proc. SPIE. 2001; 4241:260–6.

30. Kravtsov A.L., Bobyleva E.V., Grebenyukova T.P. et al. Flow cytometric analysis of phagocyte degranulation in bacteria infected whole blood cell cultures. Proc. SPIE. 2002; 4707:395–402.

31. Lauth X., von Köckritz-Blickwede M., McNamara C.W. et al. M1 protein allows group A streptococcal survival in phagocyte extracellular traps through cathelicidin inhibition. J. Innate Immun. 2009; 1:202–14.

32. Lee W.L., Grinstain S. The tangled webs that neutrophils weave. Science. 2004; 303:1477–8.

33. Lopez-Boado Y.S., Espinola M., Bahr S., Belaouaj A. Neutrophil serine proteinases cleave bacterial flagellin, abrogating its host response-inducing activity. J. Immunol. 2004; 172:509–15.

34. Ma A.C., Kubes P. Platelets, neutrophils and neutrophil extracellular traps in sepsis. J. Thromb. Haemost. 2007; 6:415–20.

35. Martinelli S., Urosevic M., Daryadel A. et al. Induction of genes mediating interferon-dependent extracellular trap formation during neutrophil differentiation. J. Biol. Chem. 2004; 279:4123–32.

36. Medina E. Neutrophil extracellular traps: a strategic tactic to defeat pathogens with potential consequences for the host. J. Innate Immun. 2009; 1(3):176–80.

37. Mizgerd J.P. Mechanisms of disease acute lower respiratory tract infection. N. Engl. J. Med. 2008; 358:716–27.

38. Oehmke S., Morgelin M., Hervald H. Activation of the human contact system on neutrophil extracellular traps. J. Innate Immun. 2009; 1:225–30.

39. Papayannopoulos V., Metzler K.D., Hakkim A. et al. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. J. Cell Biol. 2010; 191:677–91.

40. Ramos-Kichik V., Mondragon-Flores R., Mondragon M. et al. Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb). 2008; 89:29–37.

41. Silva M.T. When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system. J. Leukoc. Biol. 2010; 87:1–14.

42. Urban C.F., Reichard U., Brinkmann V. et al. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. Cell Microbiol. 2006; 8:668–76.

43. von Köckritz-Blickwede M., Goldmann O., Thulin P. et al. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular traps formation. Blood. 2008; 111:3070–80.

44. von Köckritz-Blickwede M., Nizet V. Innate immunity turned inside-out: antimicrobial defense by phagocyte extracellular traps. J. Mol. Med. 2009; 87(8):775–83.

45. Wartha F., Beiter K., Albiger B. et al. Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps. Cell Microbiol. 2007; 9:1162–71.

46. Weinrauch Y., Drujan D., Shapiro S.D. et al. Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. Nature. 2002; 417:91–4.

47. Yost C.C., Cody M.J., Harris E.S. et al. Impaired neutrophil extracellular trap (NET) formation: a novel innate immune deficiency of human neonates. Blood. 2009; 113 (25):6419–27.

48. Yousefi S., Gold J.A., Andina N. et al. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. Nat. Med. 2008; 14:949–53.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Dolgushin I.I., Andreeva Yu.S., Savochkina A.Yu. [Neutrophil Extracellular Traps and Methods of Assessment of Neutrophils Functional Status]. M.: RAMS; 2009. 208 p.

2. Isachkova L.M., Plekhova N.G. [To the development of view about anti-infective resistance]. Epidemiol. Infek. Bol. 2002; 1:11–5.

3. Kozinets G.I., Ysotsky V.V., Pogorelov V.M. et al. [Blood and Infection]. M.; 2001. 456 p.

4. Kravtsov A.L., Grebenyukova T.P., Taranenko T.M., Kuznetsov O.S., Chramchenkova T.A., Naumov A.V. [Flow cytometric monitoring for the development of neutrophil degranulation (azurophil) in the whole human blood as a response to endotoxin of *Yersinia pestis*]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 1999; 79:81–9.

5. Kravtsov A.L., Shmel'kova T.P. [Secretory degranulation of neutrophils as a trigger of inflammation and regulator of immune response: the role of serine leukocyte proteases and protease-activated receptors]. Epidemiol. Vaksinnoprofilakt. 2011; 1(56):79–87.

6. Kravtsov A.L., Shmel'kova T.P., Shchukovskaya T.N. [Influence of the anti-plague vaccination on the functional activity of human innate immunity cells]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2011; 1(107):77–80.

7. Semenov B.F., Zverev V.V. [Concept of construction of rapid immunological protection from pathogens]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 2007; 4:93–100.

8. Fradkin V.A. [Diagnostics of Allergy by Blood Neutrophil Reactions]. M.: Meditsina; 1985. 176 p.

9. Shishkova Yu.S., Savochkina A.Yu., Ryzhkova A.I., Mezentseva E.A. [Influence of "Pirogenalum" preparation on formation of neutrophils extracellular traps]. Med. Nauka Obraz. Urala. 2009; 10(3):23–4.

10. Yaglova N.V. [Mast cells and innate immunity]. Immunologia. 2009; 139–42.

Authors:

Kravtsov A.L. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Кравицов А.Л. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 07.07.11.