

21. Суранова Т.Г., Никифорова В.В. Состояние нормативной правовой базы по классификации биологических угроз. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2016, 21: 188-195.
22. Шкарин В.В., Ковалишена О.В. Новые инфекции: систематизация, проблемы, перспективы. Н. Новгород, НГМА, 2012.
23. Biorisk management. Laboratory biosecurity guidance. World Health Organization. 2013: Available from: [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_CDS\\_EPR\\_20066.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_EPR_20066.pdf).
24. Biosafety and the environment. An introduction to the Cartagena Protocol on Biosafety. United Nations Environment Programme DEC/Information Unit for Conventions International Environment House, Geneva11-13, CH-1219, Switzerland. iuc@unep.ch, www.unep.org GE.03-01836/E.
25. Guidance on regulations for the transport of infectious substances 2009-2010 WHO-2008. World Health Organization [cited 2013 April 17]. Available from: [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO\\_HSE\\_EPR\\_2008\\_10.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_HSE_EPR_2008_10.pdf).
26. James B. Petro, Theodore R. et al. Biotechnology: Impact on Biological Warfare and Biodefense. J. Bioterr and Biodef. 2003, 1: 161-167. <http://www.medscape.com/viewarticle/462541> (accessed October 14, 2009).
27. Laboratory Biorisk Management Standard (CWA 15793:2008). Canada. 2008, 7-41. Available from: [www.cen.eu/CENORM/sectors/technicalcommitteesworkshops/workshops/ws31.asp](http://www.cen.eu/CENORM/sectors/technicalcommitteesworkshops/workshops/ws31.asp).
28. Perkins D., Danskin K. On the Front Line of Biodefense: The U.S. Department of Health and Human Services Support to International Biological Risk Management Regimes. J. Bioterr. Biodef. 2011, 2: 111.
29. Public health response to biological and chemical weapons: WHO guidance World Health Organization. 2004. Available from: <http://www.who.int/csr/delibepidemics/biochemguide/en>.
30. Suk G., Zmorzynska A., Hunger I. et al. Dual-use research and technological diffusion: re-considering the bioterrorism threat spectrum. PLoS Pathog. 2011, 7: 111.

*Поступила 10.11.17*

Контактная информация: Меринова Ольга Анатольевна, к.м.н.,  
400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7, р.т. (8442)37-37-74

© Е.В.МАТОСОВА, Б.Г.АНДРЮКОВ

*Е.В.Матосова, Б.Г.Андрюков*

## **АНТИМИКРОБНЫЕ МЕХАНИЗМЫ НЕЙТРОФИЛОВ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ МИШЕНИ ДЛЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ МОДУЛЯЦИИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЗАЩИТЫ ОРГАНИЗМА**

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П.Сомова, Владивосток

Ключевую роль в неспецифической защите макроорганизма играют нейтрофилы — самый многочисленный пул лейкоцитов. Во время развития инфекции эти клетки фагоцитируют микроорганизмы, а также секретируют протеолитические ферменты, которые разрушают патогены в процессе дегрануляции. Кроме того, они образуют структуры, называемые внеклеточными нейтрофильными ловушками (NETs). В свою очередь, микроорганизмы выработали ряд механизмов, позволяющих им уклоняться от нейтрофильных атак, в том числе развиваясь в виде биопленок в организме хозяина. В связи с развитием молекулярных исследований и появлением в науке новых методов визуализации цель обзора охарактеризовать известные противомикробные механизмы нейтрофилов. В условиях нарастающей резистентности бактерий к антибиотическим препаратам антимикробные механизмы являются перспективными мишенями для фармакологической модуляции неспецифической защиты организма.

Журн. микробиол., 2018, № 3, С. 96—105

Ключевые слова: нейтрофилы, инфекции, фагоцитоз, дегрануляция, внеклеточные нейтрофильные ловушки, нетоз, биопленки, планктонные формы микроорганизмов, антибиотикорезистентность

*E.V.Matosova, B.G.Andryukov*

## **ANTIMICROBIC MECHANISMS OF NEUTROPHILES AS PERSPECTIVE TARGETS FOR PHARMACOLOGICAL MODULATION OF NON-SPECIFIC PROTECTION OF THE ORGANISM**

Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia

Key roles in nonspecific protection of the macroorganism are played by neutrophils — the most numerous pool of leukocytes. During the development of infection these cells phagocytose of microorganisms and also secrete proteolytic enzymes that destroy extracellular pathogens. In addition, they form structures called neutrophil extracellular traps (NETs). But in response, microorganisms have developed a number of mechanisms that allow them to evade neutrophilic attacks, including developing in the form of biofilms in the host organism. In this case, biofilms introduce negative properties into the infectious process: a recurring course, a tendency to chronization, resistance to traditional antimicrobial agents, which can also indicate the inaccessibility of biofilm for cells of the immune system. The purpose of the review: in connection with the development of molecular research and the appearance in science of new methods of visualization, it is necessary to characterize the known antimicrobial mechanisms of neutrophils. In conditions of increasing resistance of bacteria to antibiotic drugs, antimicrobial mechanisms are promising targets for pharmacological modulation of nonspecific defense of the body.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 3, P. 96—105

Key words: neutrophils; infections, phagocytosis, degranulation, neutrophil extracellular traps, NETosis, biofilms, planktonic forms of microorganisms, antibiotic resistance

Несмотря на то, что фагоцитарная гипотеза была предложена еще в 1883 году И.И.Мечниковым, значение нейтрофильных гранулоцитов в защите организма остается недооцененным. Долгое время нейтрофилы считались пассивными участниками эффекторного звена иммунной системы. Однако многочисленные исследования показали, что это наиболее активные и многочисленные фагоцитарные клетки, которые, препятствуя инфицированию организма хозяина, могут использовать как фагоцитоз, так и дегрануляцию, а также генерировать нейтрофильные внеклеточные ловушки (NETs).

Первой реакцией на микробную инвазию организма является покидание нейтрофилами сосудистого русла и их миграция к очагу инфицирования. Этот процесс состоит из трех основных этапов: иницирование адгезии нейтрофилов к активированным эндотелиальным клеткам, проникновение через сосудистую стенку и их миграция к месту заражения.

Процесс фагоцитоза протекает в несколько этапов: хемотаксис к микроорганизму, распознавание рецепторов, активация клеток, всасывание и переваривание патогена [1]. Хемотаксис — направленная миграция лейкоцитов в ткани хозяина в ответ на инфекцию и воспаление. Градиент концентрации хемоаттрактанта определяет направленное движение фагоцитов. Исследователи определяют две группы хемоаттрактантов как эндогенных, так и экзогенных [3]. Молекулы, высвобождаемые при гибели клеток, биоактивные пептиды (лейкотриен LTB<sub>4</sub>), хемокины (IL-8, CXCL2, CXCL1), провоспалительные цитокины (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), продуцируемые стромальными, эпителиальными и иммунными клетками, также могут быть хемоаттрактантами [7].

При инфицировании организма эндотоксины попадают в кровь, извлекаясь через

клеточные мембраны бактерий или при разрушении патогена. После этого они распознаются LPS-связывающим белком (LBP), циркулирующим в сыворотке крови и относящимся к острофазным белкам. Полученный белково-рецепторный комплекс LBP-LPS связывается с провоспалительными рецепторными комплексами, расположенными на поверхности нейтрофилов, содержащих Toll-подобный рецептор 4 (TLR4), кластер дифференцировки 14 (CD14) и миелоидный фактор дифференцировки 2 (MD-2). Дальнейший иммунный ответ организма инициируется с участием внутриклеточного TIR-домена сигнального рецептора и цитозольного адаптационного белка MyD88 [46].

Узнавание микроорганизмов нейтрофилами основано на обнаружении микроорганизмов с использованием классов поверхностных и внутриклеточных рецепторов. Нейтрофилы распознают посторонние объекты с использованием PRR [11]. В организме человека наиболее значимыми нейтрофильными структурами подобного типа являются Toll-подобные рецепторы (TLRs): TLR1, TLR2, TLR3, ... TLR10. Эти рецепторы имеют родственное родство в структуре и механизме действия. Каждый из TLRs связывается с его высококонсервативным микробным лигандом для распознавания. Лиганд является специфическим для больших групп микроорганизмов. TLRs также связываются с многочисленными эндогенными лигандами, которые образуются при повреждении собственных тканей организма (фибриноген, белки теплового шока и др.). Например, липопептиды являются лигандами для TLR1, а пептидогликаны грамположительных и грамотрицательных бактерий являются лигандами для TLR2, эндотоксин грамотрицательных бактерий — лиганд для TLR4 [34]. Связывание TLRs со специфическими лигандами приводит к активации нейтрофилов, замедляет их апоптоз и индуцирует секрецию цитокинов.

Опсонизация патогенов с участием классических опсонин IgG и с3b и рецепторов нейтрофилов Fcγ (FcγRI, FcγRII, FcγRIII) и лектинов C-типа (маннозные рецепторы, лектины, мутантные рецепторы) является мощным усилителем активности. Фагоцитоз неэффективен в отсутствие опсонизации патогена [7, 11, 46]. Однако при взаимодействии нейтрофилов с биопленками микробов опсонизация патогена не требуется, так как в матриксе содержатся вещества, которые активируют нейтрофилы [22].

Процесс разрушения инфекционных объектов нейтрофилами зависит от трех основных механизмов: 1) связанного с рецептором поглощения патогена с образованием вакуоли; 2) продуцирование в вакуолях высокотоксичных активных форм кислорода (ROS); 3) слияние вакуолей с нейтрофильными гранулами, содержащими различные антимикробные компоненты, с образованием фагосомы [12].

Далее образуется фаголизосома путем слияния фагосомы и содержимого гранул нейтрофилов (внутриклеточная дегрануляция). Внутриклеточное «переваривание» инфекционных агентов реализуется в результате активации двух сложных механизмов внутриклеточного уничтожения. Микроорганизмы внутри фаголизосомы уничтожаются действием содержимого гранул, таких как дефенсины, кателицины, катепсины, пентаксины и лактоферрин, при кислород-независимом механизме киллинга [36, 43].

Окислительное уничтожение основывается исключительно на производстве противомикробных ROS с помощью NADPH-оксидазного комплекса (NOX). Этот процесс также называют «респираторным взрывом», потому что потребление глюкозы и кислорода увеличивается в несколько раз в течение нескольких секунд [43].

NOX инициирует окислительный или респираторный взрыв, превращая кислород в супероксид, который с помощью супероксиддисмутаза расщепляет перекись водорода. Перекись водорода, в свою очередь, используется миелопероксидазой (MPO) для образования более токсичных ROS [11]. ROS одинаково токсичны как для объектов фагоцитоза, так и для нейтрофилов. Поэтому перекись водорода может быть превращена в воду под действием каталазы [36]. Кроме того, миелопероксидаза превращает перекись водорода в хлорноватистую кислоту, которая обладает мощной антимикробной активностью и является аутокринным регулятором активации нейтрофилов [13].

Респираторный взрыв изменяет экспрессию ряда генов, в результате чего гранулоцит подвергается апоптозу после фагоцитоза. Другая форма программированной гибели нейтрофилов, возникающая после фагоцитоза — некроз, при котором нарушается целостность внешней мембраны и теряется сегментация ядра. Некроз связан с влиянием факторов бактериальной патогенности, которые вызывают повреждение и гибель нейтрофилов [2].

В результате контакта опсонизированного объекта с мембраной фагоцита фагосомы и гранулы сливаются. Для максимальной эффективности пищеварения это происходит в определенной последовательности [36, 37]. Процесс поглощения опсонизированных частиц при нейтрофильном фагоцитозе происходит менее чем за 20 секунд [40]. Однако микробные клетки в биопленках менее доступны для фагоцитоза, чем отдельные клетки, называемые «планктонными» клетками. Когда нейтрофилы взаимодействуют с биопленками *Staphylococcus aureus in vitro*, почти полное отторжение двухдневной биопленки происходит в течение 45-минутного воздействия. Это является следствием разрушения внеклеточного матрикса ферментативными продуктами фагоцитов, а также прямого фагоцитоза биопленки стафилококков нейтрофилами. Исследования показали, что внеклеточный матрикс биопленок (независимо от таксономической принадлежности образующих их микроорганизмов) содержит структуры, ослабляющие фагоцитарные реакции [9].

Биопленка — уникальное сообщество микробов, закрепленных на поверхности или между собой, заключенных в матрикс полимерных веществ, выделяемых клетками. Микробам в биопленке свойственен модифицированный фенотип, характеризующийся иными параметрами роста и экспрессии специфических генов [8]. Таким образом, свойства свободноживущих планктонных клеток и микроорганизмов, входящих в биопленку, существенно различаются. Например, клетки бактерий в биопленке обладают повышенной устойчивостью к неблагоприятным факторам окружающей среды, включая влияния различных антимикробных агентов [6, 21]. В этом случае биопленки вносят отрицательные свойства в инфекционный процесс: повторяющийся курс, склонность к хронизации, устойчивость к традиционным антибиотическим препаратам.

Популяция клеток в бактериальной биопленке неоднородна. Бактерии, которые образуют биопленки, могут быть как сессильными (находясь в составе самой биопленки), так и планктонными (при их дисперсии из биопленки). Планктонные бактерии могут впоследствии образовывать новые биопленки, то есть входить в сессильную форму, когда они фиксируются на биотическом или абиотическом субстрате [10]. Согласно исследованиям, клетки, высвобождаемые из биопленки, могут быть особенно эффективными при активации воспалительных и антиген-представляющих клеток и индукции клеточного апоптоза, а также вызывать более высокую продукцию провоспалительных цитокинов [26]. Вместе с быстрорастущими бактериями существуют так называемые «persisters» — особый тип микробных клеток, в которых замедляются обменные процессы, что помогает биопленке переживать неблагоприятные условия. Клетки-persisters формируются из свободноплавающих бактерий. Эти клетки повышают устойчивость к антибиотикам, что значительно усложняет лечение бактериальных инфекций [10, 44].

Структура биопленок включает бактериальные клетки (от 5 до 35% от общего объема биопленки), часто разных видов, могут присутствовать клетки грибов и вирусов. Основной объем занят слизистым межклеточным слоем, называемым матриксом биопленки или внеклеточным полимерным веществом. Матрикс состоит из полимеров мукополисахаридов и белков. Кроме того, матрикс включает липополисахариды, протеогликаны, гликопротеины, эндополисахариды, липиды, нуклеиновые кислоты и ионы металлов [8, 10]. Нуклеиновые кислоты представлены внеклеточной ДНК (eDNA) [23]. Химический состав матрикса отличается для разных микроорганизмов. Большинство бактерий в качестве экзополисахарида содержат либо линейный гомогликан  $\beta$ -1,6-N-ацетилглюкозамин, либо целлюлозу. Некоторые микроорганизмы одновременно синтезируют несколько внеклеточных полисахаридов, включая  $\beta$ -1,6-N-ацетилглюкозамин, целлюлозу и колановую кислоту [6]. Даже в пределах вида

состав внеклеточного полимерного матрикса может быть разнообразным: например, полисахариды различных штаммов термофильного стрептококка имеют различные мономерные композиции, коэффициенты и различные молекулярные массы [35].

Биопленка формируется в несколько этапов: первичная адгезия из окружающей среды, фиксация или окончательное (необратимое) прикрепление, созревание (созревание-I), рост (созревание-II), дисперсия (распространение).

По-видимому, нейтрофилы действуют на биопленку на начальных стадиях ее образования и на планктонные клетки в момент их распространения из биопленки. Когда образуется биопленка, клетки иммунной системы образуют физический барьер на поверхности биопленки. В этих местах накопления нейтрофилов их внутриклеточное содержимое (AMP, ROS и провоспалительные вещества) часто выделяется, нанося вред поверхностным слоям биопленки, а также тканям хозяина [29].

Дегрануляция нейтрофилов является одним из процессов экзоцитоза, в результате чего нейтрофильные гранулы сливаются с цитоплазматической мембраной, высвобождая арсенал ферментов, антимикробных пептидов и других молекул в окружающие ткани [11]. Вокруг активированных нейтрофилов в результате дегрануляции образуется мощная протеолитическая среда, которая необходима для хемотаксиса иммунных клеток и развития защитной воспалительной реакции [5].

Все типы гранул нейтрофила различаются по составу и обеспечивают антимикробную функцию нейтрофилов. В своих гранулах нейтрофилы содержат более 50 соединений: ферменты, пептиды, рецепторы, а также в процессе активации образуют токсические метаболиты кислорода, азота, липидов, цитокинов и антицитокинов, вторичные продукты протеолиза [4]. Гранулы делятся на четыре типа: первичные (азурофильные), возникающие в процессе дифференцировки на стадии промиелоцита; вторичные (специфические), возникающие при трансформации нейтрофилов в миелоциты; третичные или желатиновые гранулы [25]; секреторные (везикулы), появляющиеся в зрелых сегментированных формах [14]. Содержимое гранул высвобождается в цитоплазму и в межклеточное пространство строго детерминировано. Интенсивность этого процесса регулируется структурными изменениями актинового цитоскелета, которые зависят от ответа клеточных рецепторов на внешнее стимулирование сигнала [5].

Дегрануляция инициируется активацией нейтрофилов молекулярными паттернами грамотрицательных бактерий (липополисахаридов, ЛПС) и сопровождается секрецией провоспалительных цитокинов [39] при киллинге опсонизированных микроорганизмов или взаимодействии с белками внеклеточного матрикса, такими как фибронектин, коллаген и ламинин [47]. В качестве маркера дегрануляционной активности нейтрофилов используется ряд количественных показателей, таких как увеличение внеклеточной активности эластазы, снижение внутриклеточного содержимого первичных гранул, содержащих эластазу и сериновые протеазы [33], увеличение уровня ПМН-эластаза/альфа 1-протеиназа ингибиторов (PMN-E/alpha 1-PI) в плазме [20].

Нейтрофилы используют дегрануляцию вместе с фагоцитозом против биопленок [29]. Jesaitis et al. [30] обнаружили, что нейтрофилы оседали на биопленках *Pseudomonas aeruginosa*, где они подвергались дегрануляции, лишались подвижности из-за потери своих псевдоподий, и показывали изменение в структуре мембраны на стороне, прилегающей к бактериям. В присутствии бактерий опсонизированной сывороткой миелопероксидаза высвобождалась в среду. Выделение миелопероксидазы сопровождалось высвобождением другого компонента первичной гранулы,  $\beta$ -глюкуро니다зы. Лактоферрин, составляющий специфические гранулы нейтрофилов, высвобождался после контакта нейтрофилов с опсонизированными и неопсонизированными сывороткой биопленками, предотвращал образование биопленок *P. aeruginosa* путем повышения подвижности адгезивных бактерий [30]. Meyle et al. наблюдали дегрануляцию как ответ на биопленки *S. aureus*, что подтверждалось измерением высвобожденного лактоферрина и эластазы [38].

Морфологические изменения, происходящие в нейтрофильных гранулоцитах и отличающиеся от процесса апоптоза и некроза, были описаны Takei H. et al. в 1996

году [45]. В 2004 году Brinkmann V. et al. доказали существование внеклеточных ловушек нейтрофилов (NETs) и установили их антимикробный эффект в качестве важного звена врожденного иммунитета [15]. Результаты многочисленных научных исследований и наблюдений подтвердили и расширили первоначальные суждения о роли NETs в патогенезе бактериальных, вирусных, протозойных и грибковых инфекций. Некоторое время цель создания нейтрофильных внеклеточных ловушек была не совсем ясна, но вскоре после того, как это свойство было обнаружено в тучных клетках и эозинофилах, стало понятно, что эти большие внеклеточные структуры обеспечивают физический барьер против микробного распространения, изолируют и уничтожают микробные патогены, предотвращая дальнейшую колонизацию организма хозяина [17]. В настоящее время стратегия NETs прочно утвердилась в качестве одного из основных биологических механизмов, используемых нейтрофилами при инфекционных заболеваниях. Кроме того, нейтрофильные внеклеточные ловушки вовлечены во многие воспалительные и аутоиммунные нарушения и участвуют в регуляции неинфекционных процессов [16, 32]. Феномен формирования NETs — перспективная форма программируемой клеточной гибели (нетоз).

NETs состоят из деконденсированных волокон хроматина, покрытых антимикробными гранулированными и цитоплазматическими белками, такими как миелопероксидаза, нейтрофильная эластаза (NE),  $\alpha$ -дефенсины [42], положительно заряженные гистоновые белки (в 100 раз больше бактерицидной активности, чем у дефенсинов), а также различные ферменты и белки — более 30 компонентов [24].

Результаты многолетних исследований позволили установить механизмы образования внеклеточных ловушек нейтрофилов. На данный момент существуют данные о трех моделях формирования нейтрофильных внеклеточных ловушек. Первая модель рассматривается как suicidal NETosis, длительностью 2 — 4 часа. Это наиболее описанная модель нетоза, как формы программируемой гибели клеток, связанная с нарушением целостности плазматической мембраны и высвобождением деконденсированного хроматина и содержимого гранул во внеклеточное пространство [27]. Эта модель NETosis зависит от NADPH-оксидазы и характеризуется изменением морфологии ядра, которое теряет свою специфическую структуру.

После связывания белково-рецепторного комплекса LBP-LPS с провоспалительными рецепторными комплексами, расположенными на поверхности нейтрофилов, кальциевые хранилища эндоплазматического ретикулаума выделяют  $Ca^{++}$  в цитоплазму (стадия 1). Повышенный уровень цитоплазматического кальция активирует семейство протеин киназы C (protein kinase C, PKC), которое непосредственно отвечает за активацию NADPH-оксидазы. NOX генерирует ROS и, в частности, супероксидные ионы. Генерация ROS приводит к разрыву гранул и ядерной оболочки (стадия 2). NE и MPO, обычно хранящиеся в азурофильных гранулах, мигрируют в ядро. NE разрушает линкер гистонов H1 и обрабатывает основные гистоны. В это же время катионы  $Ca^{++}$  действуют как кофакторы для пептидил-аргинин-деиминазы 4 (PAD4). Преобразование некоторых остатков аргинина в цитруллины в основных гистонах с помощью PAD4 исключает положительный заряд из этого остатка и, таким образом, ослабляет связывание гистонов с ДНК, способствуя деконденсации хроматина. MPO усиливает деконденсацию хроматина (стадия 3) [24, 49]. Наконец, нити цитоскелета сокращаются, цитоплазматическая мембрана теряет свою целостность, и активные вещества в виде молекулярного облака высвобождаются во внеклеточное пространство, формируя NETs. Это приводит к гибели клетки (стадия 4) [15].

Вторая модель формирования нейтрофильных ловушек — vital NETosis [48]. Остается открытым вопрос, можно ли считать этот процесс настоящим нетозом, поскольку после высвобождения NETs нейтрофилы все еще способны фагоцитировать патогены, и продолжительность их жизни не зависит от потери ДНК. Pilszczek F. et al. обнаружили диффузные структуры NETs, сформированные уже через 5 мин после инкубации с *S.aureus*. NETs были выпущены через небольшую область на поверхности нейтрофилов. Со временем NETs заполнили всю область обзора, и NETs из нескольких нейтрофилов слились. Признаков лизиса нейтрофилов авторы не обнаружили [41]. Byrd A. S. et al. сообщили, что наблюдали высвобождение NETs через 30 минут

после контакта нейтрофилов с *Candida albicans*, обработанных фибронектином. Фибронектин подавлял продуцирование ROS [19], что указывает на отличие между этой моделью образования внеклеточных нейтрофильных ловушек и суицидальным нетозом. Из-за короткого периода времени, необходимого для формирования NETs, этот процесс также был назван быстрым нетозом.

После стимуляции *S. aureus* нейтрофилы подверглись массивному расширению между внутренней и внешней ядерными мембранами, называемому blebbing. Внутри этого разделения ядерной мембраны были пряди ДНК со связанными нуклеосомами, имевшие ультраструктурный вид «бисера на струне». Позднее в цитоплазме активированных нейтрофилов наблюдались везикулы, отпочкованные из ядерной оболочки, в просвете которых были «бусины на струне» нитей ДНК. Но разрушение ядерной мембраны не было очевидным. Эти везикулы высвобождались во внеклеточное пространство, где они затем лизировались, а их содержимое формировало NETs. Некоторые цитоплазматические гранулы также высвобождались во внеклеточное пространство или сливались с плазматической мембраной, при этом содержимое гранул и ДНК везикул смешивалось во внеклеточном пространстве. Полное разрушение ядерной оболочки чаще всего наблюдалось через 60 мин, и ДНК заполняла цитоплазму. Но это не приводило к гибели нейтрофила [41].

Третья модель рассматривается как альтернативный механизм vital NETosis, который связан с образованием внеклеточных нейтрофильных ловушек из митохондриальной ДНК интактных нейтрофилов при индукции ROS. Везикулы, выпущенные из митохондрий во внеклеточное пространство, содержат ДНК, которые собираются в NETs. Исследования Yousefi S. et al. показали, что в высвобожденной из клетки ДНК были обнаружены только митохондриальные гены, что указывало на то, что активированные нейтрофилы специфически выделяют митохондриальную ДНК. Также как vital NETosis с выделением ядерной ДНК, этот механизм требует активации нейтрофилов, протекает быстро (уже через 15 — 20 минут после активации) и не связан с гибелью клеток [50].

Независимо от модели образования нейтрофильные внеклеточные ловушки представляют собой большие внеклеточные структуры с электростатическим зарядом [18] и сильно локализованной бактериальной активностью. Они способны обеспечивать физиологический барьер, предотвращать распространение микроорганизмов и увеличивать интерстициальную локализацию противомикробных веществ, что в конечном итоге инактивирует факторы бактериальной патогенности [16]. Микроорганизмы, попавшие в ловушки, теряют мобильность и впоследствии устраняются макрофагами. Исследования показали влияние NETs на планктонные формы грамположительной и грамотрицательной флоры, грибов, на внутриклеточные микроорганизмы, а также на простейших, которые во много раз больше нейтрофилов [17, 18, 28, 49]. Имеются данные об образовании NETs при взаимодействии нейтрофилов и биоопленок *S. epidermidis* [22].

С биоопленками *S. albicans* ситуация несколько отличается. Johnson C. et al. [31] исследовали реакцию нейтрофилов во время роста биоопленки *S. albicans*. В отличие от планктонных *S. albicans*, биоопленки вызывали незначительное высвобождение внеклеточных ловушек нейтрофилов. После опознавания биоопленки нейтрофилы округлились и стали прилипать к гифам. Через 1 час нейтрофилы были явно прикреплены к гифам и демонстрировали расширенные филоподии, часто растягивающиеся на несколько гиф. Однако через 4 ч нейтрофилы снова оказались округлыми и неактивными. Нейтрофилы оставались жизнеспособными в это время, но очень немногие из них выпустили NETs. По мнению авторов, матрикс биоопленки *S. albicans* ингибирует высвобождение внеклеточных ловушек нейтрофилов, способствуя уклонению от иммунитета и обеспечивая преимущество выживания [31].

Таким образом, в настоящее время общепризнаны 3 механизма антибактериальной защиты нейтрофилов: фагоцитоз, дегрануляция, формирование нейтрофильных

внеклеточных ловушек (NETs). Открытие NETs произошло благодаря развитию молекулярных биологических методов и улучшению качества методов визуализации. Образование NETs характеризуется выбросом генетического материала с содержимым цитоплазмы и гранул на скопление крупных патогенов, формированием сетеподобных фибриновых структур. Номенклатурный комитет по клеточной гибели (NCCD) в 2009 году рекомендовал феномен формирования NETs считать новой формой ПКГ под названием нетоз (NETosis). Антибактериальные стратегии нейтрофилов рассматриваются как перспективное направление для фармакологических модуляций в условиях нарастающей резистентности к традиционной антибиотической терапии.

*Авторы выражают признательность Быниной Марине Павловне (НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова) за помощь в подготовке материалов.*

*Работа выполнена при поддержке Комплексной программы фундаментальных исследований Дальневосточного отделения РАН «Дальний Восток», проект № 18-5-099.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. 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.
2. Андрюков Б.Г., Сомова Л.М., Дробот Е.И., Матосова Е.В. Защитные стратегии нейтрофильных гранулоцитов от патогенных бактерий. Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2017, 68 (1): 4-18.
3. Гоженко А.И., Бабий В.П., Котюжинская С.Г., Картавенко Н.П. Механизмы хемотаксиса лейкоцитов при воспалении. Актуальные проблемы транспортной медицины. 2006, 3 (5): 56-63.
4. Долгушин И.И., Савочкина А.Ю. Секреторные функции нейтрофилов. Аллергология и иммунология. 2015, 16 (2): 210-212.
5. Кравцов А.Л., Шмелькова Т.П. Секреторная дегрануляция нейтрофилов как триггер воспаления и регулятор иммунного ответа: роль сериновых лейкоцитарных протеаз и протеолитически активируемых рецепторов. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2011, 1 (56): 79-87.
6. Куклева Л.М., Ерошенко Г.А., Видяева Н.А., Кутырев В.В. Бактериальная биопленка и особенности ее образования у возбудителя чумы и других патогенных иерсиний. Проблемы особо опасных инфекций. 2011, 4 (110): 5-11.
7. Лядова И.В., Цыганов Е.Н., Костюкевич М.В. Нейтрофилы при туберкулёзе: протекция или патология? Туберкулез и болезни легких. 2012, 89 (7): 12-21.
8. Мальцев С.В., Мансурова Г.Ш. Что такое биопленка? Практическая медицина. 2011, 5 (53): 7-10.
9. Чеботарь И.В. Механизмы антибиопленочного иммунитета. Вестник РАМН. 2012, 12: 22-29.
10. Шлепотина Н.М., Плоткин Л.Л., Белов В.В. Микробиологическое и клиническое значение биопленочных инфекций. Уральский медицинский журнал. 2014, 4 (118): 106-112.
11. Bardoel B.W., Kenny E.F., Sollberger G. et al. The balancing act of neutrophils cell host and microbe. Cell Host Microbe. 2014, 15 (5): 526-536.
12. Benarafa C., Simon H.U. Role of granule proteases in the life and death of neutrophils. Biochem Biophys Res. Commun. 2017, 482 (3): 473-481.
13. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. Immunity. 2010, 33 (5): 657-670.
14. Borregaard N., Sørensen O.E., Theilgaard-Mönch K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. Trends Immunol. 2007, 28 (8): 340-345.
15. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science. 2004, 303 (5663): 1532-1535.
16. Brinkmann V., Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. Nat. Rev. Microbiol. 2007, 5 (8): 577-582.
17. Brinkmann V., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? J. Cell Biol. 2012, 198 (5): 773-783.
18. Bruns S., Kniemeyer O., Hasenberg M. et al. Production of extracellular traps against *Aspergillus fumigatus* in vitro and in infected lung tissue is dependent on invading neutrophils and influenced by hydrophobin RodA. PLoS Pathog. 2010, 6 (4): e1000873.
19. Byrd A.S., O'Brien X.M., Johnson C.M. et al. An extracellular matrix-based mechanism of rapid

- neutrophil extracellular trap formation in response to *Candida albicans*. *J. Immunol.* 2013, 190 (8): 4136-4148.
20. Cojocaru I.M., Cojocaru M., Burcin C. Evaluation of granulocyte elastase as a sensitive diagnostic parameter of inflammation in first ischemic stroke. *Rom. J. Intern. Med.* 2006, 44 (3): 317-21.
  21. Cooper R.A., Bjarnsholt T., Alhede M. Biofilms in wounds: a review of present knowledge. *J. Wound Care.* 2014, 23 (11): 570, 572-574, 576-580.
  22. Dapunt U., Hansch G.M., Arciola C.R. Innate immune response in implant-associated infections: neutrophils against Biofilms. *Materials.* 2016, 9(5); 387.
  23. Das T., Sehar S., Manefield M. The roles of extracellular DNA in the structural integrity of extracellular polymeric substance and bacterial biofilm development. *Environ. Microbiol. Rep.* 2013, 5 (6): 778-786.
  24. Delgado-Rizo V., Martínez-Guzmán M.A., Iñiguez-Gutierrez L. et al. Neutrophil extracellular traps and its implications in inflammation: An overview. *Front. Immunol.* 2017, 8: 81.
  25. Faurischou M., Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microb Infect.* 2003, 5 (14): 1317-1327.
  26. Franca A., Perez-Cabezas B., Correia A. et al. *Staphylococcus epidermidis* biofilm-released cells induce a prompt and more marked in vivo inflammatory-type response than planktonic or biofilm cells. *Front. Microbiol.* 2016, 7: 1530.
  27. Fuchs T.A., Abed U., Goosmann C. et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biology.* 2007, 176 (2): 231-241.
  28. Guimarães-Costa A.B., Nascimento M.T., Froment G.S. et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *PNAS USA.* 2009, 106 (16): 6748-6753.
  29. Hirschfeld J. Dynamic interactions of neutrophils and biofilms. *J. Oral Microbiol.* 2014, 6: 26102.
  30. Jesaitis A.J., Franklin M.J., Berglund D. et al. Compromised host defense on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: characterization of neutrophil and biofilm interactions. *J. Immunol.* 2003, 171 (8): 4329-4339.
  31. Johnson C.J., Cabezas-Olcoz J., Kernien J.F., et al. The extracellular matrix of *Candida albicans* biofilms impairs formation of neutrophil extracellular traps. *PLoS Pathog.* 2016, 12 (9): e1005884.
  32. Jorch S.K., Kuberski P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat. Med.* 2017, 23 (3): 279-287.
  33. Katsumata S., Nagashima M., Kato K. et al. Changes in coagulation-fibrinolysis marker and neutrophil elastase following the use of tourniquet during total knee arthroplasty and the influence of neutrophil elastase on thromboembolism. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2005, 49 (4): 510-516.
  34. Kawai T., Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity.* 2011, 34 (5): 637-650.
  35. Li X., Kong H., Mout R. et al. Rapid identification of bacterial biofilms and biofilm wound models using a multichannel nanosensor. *ACS Nano.* 2014, 8 (12): 12014-12019.
  36. 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): e54735.
  37. Mantovani A., Cassatella M.A., Costantini C. et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2011, 11 (8): 519-531.
  38. Meyle E., Brenner-Weiss G., Obst U. et al. Immune defense against *S. epidermidis* biofilms: components of the extracellular polymeric substance activate distinct bactericidal mechanisms of phagocytic cells. *Int. J. Artif. Organs.* 2012, 35 (10): 700-712.
  39. Naegelen I., Beaume N., Plançon S. et al. Regulation of neutrophil degranulation and cytokine secretion: A novel model approach based on linear fitting. *J. Immunol. Res.* 2015, 2015: 817038.
  40. Nordenfelt P., Tapper H.J. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J. Leukoc Biol.* 2011, 90 (2): 271-284.
  41. Pilszczek F.H., Salina D., Poon K.K. et al. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.* 2010, 185 (12): 7413-7425.
  42. Porto B.N., Stein R.T. Neutrophil extracellular traps in pulmonary diseases: Too much of a good thing? *Front. Immunol.* 2016, 7: 311.
  43. Silva L.M., Muñoz-Caro T., Burgos R.A. Far beyond phagocytosis: Phagocyte-derived extracellular traps act efficiently against protozoan parasites in vitro and in vivo. *Mediators Inflamm.* 2016, 2016: 5898074.

44. Singh R., Ray P., Das A. et al. Role of persisters and small-colony variants in antibiotic resistance of planktonic and biofilm-associated *Staphylococcus aureus*: an in vitro study. *J. Med. Microbiol.* 2009, 58: 1067-1073.
45. Takei H., Araki A., Watanabe H. et al. 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 (2): 229-240.
46. Tamassia N., Le Moigne V., Calzetti F. et al. The MyD88-independent pathway is not mobilized in human neutrophils stimulated via TLR4. *J. Immunol.* 2007, 178 (11): 7344-7356.
47. Tavares N., Afonso L., Suarez M. et al. Degranulating neutrophils promote leukotriene B4 production by infected macrophages To kill leishmania amazonensis parasites. *J. Immunol.* 2016, 196 (4): 1865-1873.
48. Yang H., Biermann M.H., Brauner J.M. et al. New insights into neutrophil extracellular traps: Mechanisms of formation and role in inflammation. *Front. Immunol.* 2016, 7: 302.
49. Yipp B.G., Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood.* 2013, 122: 2784-2794.
50. Yousefi S., Mihalache C., Kozlowski E. et al. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ.* 2009, 16 (11): 1438-1444.

*Поступила 04.12.17*

Контактная информация: Матосова Екатерина Владимировна,  
690087, Владивосток, ул. Сельская, 1, р.т. 8 (423) 244-26-04

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*А.О.Семенцова<sup>1</sup>, В.Г.Дедков<sup>2,3</sup>, В.А.Терновой<sup>1</sup>, Е.В.Чуб<sup>1</sup>,  
С.А.Пьянков<sup>1</sup>, А.П.Агафонов<sup>1</sup>, Р.А.Максютов<sup>1</sup>, В.В.Малеев<sup>2</sup>, А.Ю.Попова<sup>4,5</sup>*

## **КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЛИХОРАДКИ ЭБОЛА. АНАЛИЗ СУЩЕСТВУЮЩИХ МЕТОДИК И ДИАГНОСТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ**

<sup>1</sup>ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», п. Кольцово, Новосибирская обл.; <sup>2</sup>Центральный НИИ эпидемиологии; <sup>3</sup>НИИ медицины труда; <sup>4</sup>Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; <sup>5</sup>Российская медицинская академия последиplomного образования, Москва

Лихорадка Эбола — особо опасная вирусная инфекция, протекающая в виде геморрагической лихорадки, характеризующейся острым течением и высокой летальностью, обусловленной полиорганной недостаточностью и развитием инфекционно-токсического шока. Природные очаги лихорадки Эбола расположены в лесных районах центральной и западной частей Африканского континента. Долгие годы считалось, что заболеваемость лихорадкой Эбола носит спорадический характер и бремя ее актуально исключительно для эндемичных районов. Однако беспрецедентная по своим масштабам эпидемия лихорадки Эбола в 2013 — 2016 гг., вызванной вирусом Заир, существенно изменила представления о данном заболевании и о закономерностях его распространения. Во время эпидемии были выявлены слабые места в организации противоэпидемических мероприятий, эффективность которых оказалась на начальном этапе не очень высокой, в том числе и по причине отсутствия диагностических средств. Тем не менее, в ходе ликвидации эпидемии в Западной Африке система противоэпидемических мероприятий была существенно изменена, во многом благодаря оперативно разработанным средствам лабораторной диагностики. Данный обзор посвящен анализу методов и средств лабораторной диагностики лихорадки Эбола с учетом опыта, полученного в ходе эпидемии 2013 — 2016 гг. в Западной Африке.

*Журн. микробиол., 2018, № 3, С. 105—116*

Ключевые слова: лихорадка Эбола, молекулярная диагностика, иммунохроматография, ИФА