

28. Rice C.E., Konst H., Duthie R.C. Studies by complement-fixation methods of malleins produced in broth and synthetic media. I. Relative immunizing activities in horses and rabbits copyright and license information. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 1951, 15 (12): 284-291.
29. Rugdech P., Anuntagool N., Sirisinha S. Monoclonal antibodies to *Pseudomonas pseudomallei* and their potential for diagnosis of melioidosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* March. 1995, 52: 231-235.
30. Sermswan R.W., Wongratanacheewin S., Anuntagool N. et al. Comparison of the polymerase chain reaction and serologic tests for diagnosis of septicemic melioidosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2000, 63: 146-149.
31. Sirisinha S., Anuntagool N., Dharakul T. et al. Recent developments in laboratory diagnosis of melioidosis. *Acta Tropica.* 2000, 74: 235-245.
32. Strauss A., Alexander A.D., Rapmaund G. Melioidosis in Malaysia. Antibodies to *Pseudomonas pseudomallei* in human population. 1969, 18 (1): 703-707.
33. Tiyawisutsri R., Peacock S.J., Langa S. et al. Antibodies from patients with melioidosis recognize *Burkholderia mallei* but not *Burkholderia thailandensis* antigens in the indirect hemagglutination assay. *J. Clin. Microbiol.* 2005, 43: 4872-4874.
34. Westphal O., Jan K. Bacterial lipopolysaccharides; extraction with phenol-water and further applications of the procedures. *Methods Carbohydr. Chem.* 1965, 5: 83-91.
35. Wheelis M. First shots fired in biological warfare. *Nature.* 1998, 395: 213.

Поступила 2002.16

Контактная информация: Будченко Анатолий Александрович, к.б.н.,
400087, Волгоград, ул. Голубинская 7, р.т. (8442)36-37-43

© А.Л.КРАВЦОВ, 2016

А.Л.Кравцов

РОЛЬ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК ПРИ ОСОБО ОПАСНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЯХ

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Приводятся новые сведения о нейтрофильных внеклеточных ловушках (НВЛ), осуществляющих захват и киллинг патогенных микроорганизмов с большей эффективностью, чем при фагоцитозе. Представлен современный взгляд на то, каким образом нейтрофилы выбирают внутриклеточный (фагоцитоз) или внеклеточный (нетоз) механизм бактерицидности при взаимодействии с патогенными микроорганизмами. Проанализированы экспериментальные данные о наличии у возбудителей чумы, холеры и мелиоидоза механизмов защиты от бактерицидного эффекта НВЛ, а также о роли НВЛ в регуляции иммунного ответа и развитии сепсиса.

Журн. микробиол., 2016, № 4, С. 95—104

Ключевые слова: нейтрофильные внеклеточные ловушки, чума, сибирская язва, холера, мелиоидоз

A.L.Kravtsov

ROLE OF NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS IN ESPECIALLY DANGEROUS BACTERIAL INFECTIONS

Russian Research Institute of Plague Control «Microbe», Saratov, Russia

Novel data on neutrophil extracellular traps (NET), carrying out capture and killing of pathogenic microorganisms with higher effectiveness than during phagocytosis, are presented. A contemporary view on how neutrophils choose intracellular (phagocytosis) or extracellular

(NETosis) mechanism of bactericidity during interaction with pathogenic microorganisms is given. Experimental data on the presence in causative agents of plague, cholera and melioidosis of mechanisms of protection from bactericidal effect of NET, as well as NET's role in regulation of immune response and sepsis development are analyzed.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 4, P. 95—104

Key words: neutrophil extracellular traps, plague, anthrax, cholera, melioidosis

Долгие годы традиционно полагали, что нейтрофильные гранулоциты (НГ) — это примитивные микрофагоциты, которые после выхода из костного мозга становятся конечно дифференцированными клетками, способными к осуществлению только фагоцитарной функции и не способными к трансформации, дифференцировке, экспрессии генов и белковому синтезу. Эти представления оказались ошибочными, и результаты современных фундаментальных исследований убедительно свидетельствуют, что НГ являются одними из ключевых эффекторных и регуляторных клеток, участвующих в реализации как врожденного, так и адаптивного иммунитета. Они играют важную роль в иммунопатогенезе широкого спектра заболеваний инфекционной и неинфекционной этиологии [8].

Взгляды на роль нейтрофилов при особо опасных бактериальных инфекциях (ООБИ) существенно изменились за последнее десятилетие [21, 30, 36, 37, 39] во многом благодаря открытию в 2004 г. немецкими учеными из Института инфекционной биологии ранее неизвестного механизма киллинга бактерий, в основе которого лежит способность НГ формировать во внеклеточном пространстве бактерицидные ДНК-содержащие сетевидные структуры, названные нейтрофильными внеклеточными ловушками (НВЛ) (NETs — Neutrophil Extracellular Traps)[13].

В нашем обзоре за 2012 г., посвященном вопросу формирования внеклеточных ловушек при взаимодействии клеток врожденного иммунитета с патогенными микроорганизмами [6], не было сведений об эффективности киллинга возбудителей ООБИ в НВЛ, поскольку такая информация стала появляться в зарубежной печати лишь с декабря 2010 г. [15]. Этих сведений нет и в других недавно опубликованных русскоязычных обзорах [2, 3], посвященных участию НВЛ в защитных и патологических реакциях организма.

Целью настоящей работы явился анализ литературных данных об эффективности обезвреживания возбудителей ООБИ в НВЛ, а также о роли НВЛ в регуляции иммунного ответа и развитии характерных для сепсиса инфекционных осложнений.

Уже через год после открытия ДНК-содержащих нейтрофильных ловушек Mayer-Scholl A. et al. отмечают в своей публикации [30], что выяснение причин различной степени тяжести течения у пациентов кожной и респираторной форм сибирской язвы зависит от дальнейшего исследования недостаточно изученных механизмов бактерицидности, используемых клетками первой линии врожденной антибактериальной защиты при этом особо опасном инфекционном заболевании. Изучая *in vitro* взаимодействие *Bacillus anthracis* с нейтрофилами крови человека, эти исследователи установили, что НГ активно поглощают и внутриклеточно обезвреживают споры возбудителя сибирской язвы, в то время как киллинг крупных вегетативных клеток *B. anthracis* осуществляется с участием внеклеточного механизма бактерицидности. Этот механизм функционировал в присутствии ингибитора фагоцитоза цитохала-

зина D, и эффективность внеклеточного киллинга клеток возбудителя сибирской язвы не зависела от экспрессии ими капсулы и/или токсина. Представленный в работе результат электронно-микроскопического анализа свидетельствовал, что крупные вегетативные клетки *V. anthracis* захватываются ДНК-сетями НВЛ, что НВЛ принимают участие в обезвреживании устойчивых к фагоцитозу клеток возбудителя сибирской язвы.

Процесс образования экстрацеллюлярных сетей нейтрофилами принято называть нетозом (NETosis), и считается, что нетоз — это резервная форма убийства бактерий, запускаемая при неудачном фагоцитозе, когда фагоцитоз крупных частиц не удается [3]. В работе Branzk N. et al. [12] впервые убедительно было доказано, что у НГ фагоцитоз играет роль сенсорного механизма, который определяет размер патогенных микроорганизмов с помощью поверхностного клеточного рецептора дектина-1. Нейтрофилы активно поглощали отдельные мелкие бактерии или мелкие дрожжевые клетки, и фагоцитоз подавлял процесс транслокации лейкоцитарной эластазы из первичных гранул в ядра НГ. В случаях контакта с поверхностью НГ крупных внеклеточных конгломератов *Mycobacterium bovis* или крупных клеток *Candida albicans* фагоцитоз отсутствовал. Это приводило к попаданию высвобождаемой из гранул эластазы не в фагосомы, а в ядра нейтрофилов и, как следствие [34], к расщеплению ядерных гистонов, к деконденсации ядерного хроматина, а затем к секреции ядерной ДНК, «декорированной» бактерицидными катионными белками и антибактериальными пептидами (НВЛ), во внеклеточное пространство. Включался, таким образом, альтернативный фагоцитозу механизм обезвреживания патогенных микроорганизмов, что объясняло важную роль НГ в защите от *S. albicans*, несмотря на их неспособность фагоцитировать крупные клетки этого патогенного микроорганизма. Кроме того, полученная информация объясняет, по мнению авторов [12], способность ингибиторов микробной агглютинации предотвращать развитие характерных для сепсиса инфекционных осложнений [31].

Известно, что отдельные мелкие бактерии с относительно низким уровнем содержания на клетку суммарного белка и ДНК (менее двух полных копий хромосом) преобладают в оптически плотных микробных взвесах, приготовленных в экспериментальных условиях из стационарных бактериальных культур с очень высокой клеточной концентрацией. При переходе микробной популяции в быструю экспоненциальную фазу роста в условиях *in vivo* или *in vitro* такие бактерии из нее исчезают и заменяются на более крупные с повышенным относительным содержанием ДНК (от двух до четырех и более полных копий хромосом) и белка [18]. Более того, для выживания в организме хозяина или в объектах внешней среды патогенные бактерии образуют биопленки [20, 38, 46]. В плазме крови и тканях организма они могут формировать устойчивые к фагоцитозу крупные микробные конгломераты либо нитевидные структуры, состоящие из нескольких бактерий [20, 31, 35]. В виде крупных конгломератов в чувствительный организм хозяина попадают вирулентные *Yersinia pestis* из пищеварительного тракта блох [7] и холерные вибрионы из природных водоемов [38]. Поскольку при контакте с НГ крупные микробные конгломераты запускают процесс формирования НВЛ [12], необходимо изучение роли НВЛ в обезвреживании биопленок, образуемых клетками возбудителей ООБИ.

Некоторые исследователи считают, что в защите кровотока от патогенных бактерий роль НВЛ не очень велика, так как в своих экспериментах *in vitro* они регистрировали в цельной крови способность к формированию НВЛ лишь

у 6 — 7% нейтрофилов [3]. Однако в данном случае использовались микробные клетки из оптически плотных стационарных бактериальных культур, а они и не должны быстро запускать процесс формирования НВЛ. Кроме того, присутствующий в пробе антикоагулянт мог подавлять процесс взаимодействия бактерий с клетками крови. Результаты наших проточно-цитофлуориметрических исследований свидетельствуют, что если использовать цельную дефибринированную кровь (без антикоагулянта), обсемененную живыми клетками суточной культуры *Staphylococcus aureus*, то в интервале времени от 3 до 4 ч инкубации можно наблюдать, как при исходных микробных нагрузках более 5×10^6 м.к./мл крови развивается полная азурофильная дегрануляция около 100% нейтрофилов в суммарной лейкоцитарной популяции [26]. То есть, когда бактерий в крови было больше, чем лейкоцитов (нагрузки более 1 бактерии/лейкоцит) и все они вступали в контакт с клетками врожденного иммунитета, содержащее первичных гранул, необходимое для формирования НВЛ (эластаза и миелопероксидаза) [34], высвобождалось *in vitro* из всех присутствующих в крови нейтрофилов. По данным литературы [22], именно в промежутке времени от 3 до 4 ч подавляющее число нейтрофилов начинает формировать НВЛ в ответ на контакт с живыми клетками золотистого стафилококка в условиях *in vitro*. Образование НВЛ в крови — это очень сложный и еще недостаточно изученный процесс, в регуляции которого участвуют, как известно, тромбоциты [28], активированные эндотелиальные клетки [24], и продукты лизиса эритроцитов [16]. При выявлении НВЛ методами микроскопического анализа необходимо учитывать, что эритроциты и тромбоциты в огромном количестве адсорбируются в ДНК-содержащих сетях, формируемых НГ [23], а это существенно затрудняет визуальное обнаружение ловушек в образцах цельной крови.

Nickey H.J. и Kubes P. [25], анализируя в своей обзорной статье современные достижения в области изучения «внутрисосудистого» иммунитета при инфекциях, отмечают, что хотя реализуемый при фагоцитозе внутриклеточный механизм бактерицидности достаточно хорошо изучен и описан в литературе, роль данного механизма с точки зрения обезвреживания бактерий в кровяном русле до конца не ясна. По их мнению, в динамической системе, где нейтрофилы и бактерии быстро движутся в потоке крови, фагоцитоз может быть не эффективен, в отличие от внеклеточного механизма бактерицидности, который реализуется с помощью ДНК-сетей, забрасываемых в поток крови для вылавливания и обезвреживания патогенных бактерий на расстояниях, значительно превышающих размеры самих НГ.

В связи с вышеизложенным, очень важна информация о роли НВЛ в антибактериальной защите, полученная McDonald B. et al. [32] на модели мышей, внутрибрюшинно зараженных *Escherichia coli*. В этих исследованиях впервые убедительно было доказано, что *in vivo* нейтрофилы высвобождают экстрацеллюлярные сети, состоящие из ДНК и бактерицидных продуктов цитоплазматических гранул, для захвата бактерий в потоке крови и повышения эффективности киллинга их в кровяном русле при развитии бактериемии, предотвращая, таким образом, микробную диссеминацию. При сепсисе и эндотоксемии НГ секретировали внутрисосудистые НВЛ во внутридольковых синусоидных гемокапиллярах печени в результате взаимодействия с активированными инфекционным агентом тромбоцитами. Когда в кровотоке формировались НВЛ, эффективность захвата и киллинга бактерий в условиях *in vivo* повышалась в 4 раза, в сравнении с базовым уровнем, обеспечиваемым макрофагальным фагоцитозом.

Ранее способность НГ к быстрому (30 мин) формированию НВЛ в кровяном русле была зарегистрирована Clark S.R. et al. [17] при изучении взаимодействия нейтрофилов крови с тромбоцитами, активированными липополисахаридом (ЛПС) *E. coli* через TLR4 на клеточной поверхности. Было установлено, что TLR4 на тромбоцитах в 100 — 1000 раз чувствительнее к активирующему эффекту ЛПС, чем TLR4 нейтрофилов, и предложена гипотеза, согласно которой тромбоциты выполняют в крови роль барометра, показывающего высокую степень клеточной активации с интенсивным образованием НВЛ под влиянием бактериальных ЛПС только при наиболее опасных системных бактериальных инфекциях. Чрезмерное образование НВЛ, играющее важную роль в развитии тромбгеморрагических осложнений и полиорганной недостаточности, наблюдается при эндотоксическом шоке, вызванном у животных летальными дозами ЛПС [42], а также при сепсисе у пациентов, зараженных ООБИ (мелиоидозом) [19].

По данным Eisele N.A. et al. [21] через хемокиновый рецептор CXCR2 активируется не только хемотаксис нейтрофилов к очагу воспаления, но и запускаются *in vivo* уникальные защитные иммунологические механизмы, участвующие в обезвреживании вирулентных возбудителей чумы при аэрогенном заражении, что меняет представление о роли процесса функциональной активации нейтрофилов при чумной инфекции. Клетки приобретали чувствительность к CXCR2-независимому клиренсу в результате делеции локуса пигментации (*pgm*). Это означало, что *pgm* locus кодирует факторы вирулентности *Y. pestis*, которые ингибируют функциональную активацию нейтрофилов, важную для обезвреживания вирулентных возбудителей чумы, но при этом не зависящую от миграции НГ из кровяного русла. Ссылаясь на работу Marcos V. et al. [29], американские ученые отмечают, что известен пока только один из таких механизмов активации НГ, который связан с секрецией НВЛ в ответ на контакт нейтрофилов с живыми инфекционными агентами. Поэтому не исключено, что экстрацеллюлярные ДНК-сети играют определенную роль в обезвреживании *Y. pestis*. Интересно, что уникальной способностью образовывать в пищеварительном тракте блох комков микробной массы, состоящий из очень крупных бактериальных конгломератов, обладают клетки *Y. pestis* с фенотипом Pgm^+ . Бактерии с Pgm^- фенотипом растут в желудке переносчика в виде рыхлой бактериальной массы, которая состоит из отдельных микробных клеток и легко смывается стружкой крови, поглощаемой насекомым при повторном кровососании [7]. На участие НВЛ в обезвреживании *Y. pestis* косвенно указывают также данные о ключевой роли лейкоцитарной эластазы в расщеплении факторов вирулентности (*Yops*), кодируемых плазмидой кальцийзависимости *Yersinia spp.* (*Yops*) [45].

Особый интерес представляют выводы исследований Casutt-Meyer S. et al. [15] о наличии у *Y. pestis*, как у возбудителя «кровяной» инфекции, уникального механизма защиты от бактерицидного эффекта НВЛ, которого нет у *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia enterocolitica*. Суть данного механизма заключается в существенном снижении при температуре организма хозяина уровня адсорбции *Y. pestis* в НВЛ за счет утраты в процессе эволюции гена *yadA*, кодирующего продукцию адгезина A (*YadA*). В опытах со штаммами *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* было установлено, что при контакте с нейтрофилами все они запускают нетоз, но только те из них, которые продуцировали *YadA*, адсорбировались в экстрацеллюлярных ДНК-сетях и поэтому были чувствительны к бактерицидному эффекту НВЛ. Причем высокая чувствительность к киллингу в НВЛ сочеталась с повышенной устойчивостью

к фагоцитозу и защищенностью от бактерицидного эффекта комплемента. Введение функционального гена *yadA* в клетки *Y. pestis* приводило к повышению их чувствительности к киллингу в экстрацеллюлярных ДНК-сетях, формируемых нейтрофилами. При этом вирулентность *Y. pestis* существенно снижалась.

Считается, что роль НВЛ чрезвычайно важна в антибактериальной защите слизистых оболочек, так как нейтрофилы в значительном количестве выходят из циркуляции в слизистый секрет бронхоальвеолярного, кишечного и урогенитального эпителия, где под влиянием резидентной микрофлоры и растворимых медиаторов они выбрасывают внеклеточные ловушки, которые, встраиваясь в муциновый биослой, создают на поверхности эпителиоцитов сеть, непроницаемую и губительную для бактерий. Слизистая пробка шейки матки, например, буквально пронизана ДНК-содержащими сетями. Однако сперматозоиды легко проникают сквозь эти сети, так как в составе эякулята для этого присутствует в необходимой концентрации нуклеаза (ДНКаза I) [3]. За счет продукции специальных нуклеаз преодолевать защитный барьер НВЛ в слизистых оболочках могут и патогенные бактерии. Например, клетки *Streptococcus pneumoniae* [11].

При колонизации кишечника клетки *Vibrio cholerae* продуцируют во внеклеточное пространство две нуклеазы (Dns и Xds), необходимые по данным Serep A. et al. [37] для разрушения ДНК-содержащих ловушек, формируемых нейтрофилами в слизистом секрете кишечного эпителия. Ранее эти исследователи установили важную роль двух нуклеаз *V. cholerae* в формировании биопленок во внешней среде, в использовании внеклеточной молекулы ДНК как источника фосфата при дефиците питательных веществ в водоемах [38]. Они обратили внимание на тот факт, что штаммы, утратившие способность продуцировать нуклеазы, не колонизируют кишечник мышей с нормальным функционированием клеток иммунной системы, в отличие от мышей с врожденной нейтропенией. Был сделан важный вывод, что колонизация кишечника клетками холерного вибриона является процессом, зависящим от НГ, от функции клеток первой линии врожденной антибактериальной защиты, тесно связанной с секрецией их молекулы ДНК во внеклеточное пространство. Проведенные исследования экспериментально доказали [37], что при контакте выделенных из крови нейтрофилов с клетками *V. cholerae* высвобождаются НВЛ. Причем, попавшие в ДНК-сети холерные вибрионы выживали только тогда, когда в присутствии НВЛ они начинали секретировать во внешнюю среду нуклеазы Dns и Xds. Все штаммы, дефектные по продукции нуклеаз, быстро погибали в НВЛ и не колонизировали кишечник.

Анализ литературы свидетельствует, что при ООБИ роль НВЛ еще только начинает изучаться, а наиболее интенсивные исследования в этом направлении ведутся в настоящее время с возбудителем мелиоидоза — *Burkholderia pseudomallei* [19, 36]. Видимо, по той причине, что ДНК-содержащие ловушки, являясь связующим звеном между инфекцией, воспалением и тромбозом [23], играют важную роль в развитии сепсиса [14, 28, 32, 42], а мелиоидоз — это хорошая клиническая модель для изучения сепсиса, индуцированного особо опасными грамотрицательными бактериями [41].

В исследованиях Riyara D. et al. [36] впервые была установлена способность нейтрофилов осуществлять киллинг клеток *B. pseudomallei* путем секреции НВЛ. Нейтрофилы крови человека при контакте с живыми клетками возбудителя мелиоидоза формировали НВЛ в зависимости от исходной микробной

нагрузки и времени инкубации. Повышенный уровень образования и секреции ДНК-содержащих сетей регистрировали при контакте нейтрофилов с мутантами *B. pseudomallei*, дефектными по синтезу полисахаридной капсулы и/или по продукции факторов вирулентности (Bsa), относящихся к секреторной системе III типа (T3SS — type III protein secretion system). Взаимодействие НГ с такими мутантами ассоциировалось с увеличенной интенсивностью киллинга бактерий, что позволило сделать вывод о существовании у возбудителя мелиоидоза молекулярных механизмов защиты от бактерицидного эффекта НВЛ, связанных с продукцией капсулы и белков вирулентности.

Более детально роль нетоза при ООБИ была изучена de Jong H.K. et al. на моделях мелиоидозного сепсиса у людей и лабораторных животных [19]. Эти исследования подтвердили, что НВЛ проявляют антибактериальную активность по отношению к *B. pseudomallei*, а также впервые экспериментально доказали факт секреции нейтрофилами в плазму крови ядерной ДНК и эластазы при взаимодействии с клетками возбудителя мелиоидоза в условиях *in vivo*. Формирование внутрисосудистых НВЛ приводило к эмболии мелких сосудов конгломератами ДНК-содержащих сетей, к повреждению клеток печени и других органов при экспериментальном мелиоидозном сепсисе. После введения животным нуклеазы, разрушающей НВЛ, степень этого повреждения снижалась, что коррелировало с понижением в плазме крови концентрации нуклеосом и лейкоцитарной эластазы. Нетоз не предотвращал бактериальную диссеминацию при экспериментальном мелиоидозе, и в клинических условиях регистрировали чрезмерное формирование НВЛ при мелиоидозном сепсисе, которое играло важную роль в развитии инфекционных осложнений и имело прогностическое значение. Степень тяжести этих осложнений, оцениваемая по комплексу традиционных клинических показателей, строго коррелировала с уровнем повышения концентрации в плазме крови нуклеосом и лейкоцитарной эластазы.

Хорошо известно, что при сепсисе, когда нарушается баланс в системе эластаза — ингибиторы, эта протеаза представляет огромную опасность для организма, так как является ключевым эндогенным медиатором повреждения эндотелия сосудов и индуктором развития системного воспалительного процесса [43]. Однако необходимо отметить, что при инфекциях уровень содержания в крови эластазы и других опасных для организма продуктов распада НГ (DAMPs — damage-associated molecular patterns) может существенно повышаться не только при нетозе, но и при индуцируемом патогенными бактериями постапоптотическом (вторичном) некрозе [40].

Защитить организм от чрезмерного воспаления и предотвратить септический шок при инфекциях позволяют, как известно, иммунологические механизмы, лежащие в основе феномена толерантности к ЛПС [33], которые изложены в современной концепции быстрой иммунологической защиты от патогенов [9]. Однако вклад различных механизмов бактерицидности в обеспечение повышенной эффективности киллинга бактерий в организме толерантных животных впервые был оценен экспериментально лишь в 2012 г. в фундаментальных исследованиях Landoni V.I. et al. [27]. Толерантные мыши, у которых характерную иммунологическую перестройку организма создавали путем длительного внутривенного введения малых доз ЛПС (в течение первых 2 суток по 5 мкг, а затем еще 2 суток по 10 мкг на мышь), приобретали способность к более эффективной борьбе с полимикробной внутрибрюшинной инфекцией, причем как в присутствии, так и в отсутствии перитонеальных макрофагов. Ключевую роль в антибактериальной защите играл в данном

случае не фагоцитоз, а внеклеточный киллинг патогенных бактерий в ДНК-содержащих ловушках, формируемых при гибели (нетозе) активированных нейтрофилов, быстро мигрирующих из сосудистого русла (из маргинального пула НГ) в брюшную полость лабораторных животных.

Таким образом, при повторном контакте организма с инфекционным агентом включается очень важный иммунологический механизм антибактериальной защиты, основанный на обезвреживании микроорганизмов в НВЛ. Этот механизм, функционирующий независимо от фагоцитарной активности полиморфноядерных лейкоцитов и макрофагов, нуждается в детальном изучении при ООБИ. В настоящее время при оценке напряженности антибактериального иммунитета при ООБИ, наряду с определением степени активации Т-клеточного звена иммунологической защиты, используют на практике такой показатель, как интенсивность лизиса лейкоцитов при повторном контакте их в крови со специфическим антигеном (с убитыми микробными клетками) *in vitro* [1]. Приобретенный антибактериальный иммунитет можно также оценивать *in vitro* по показателю повреждения нейтрофилов (тест ППН) [10]. Вполне вероятно, что повышенные значения показателя повреждения лейкоцитов крови после вакцинации отражают активацию процесса формирования НВЛ. В пользу справедливости такого предположения свидетельствует, например, способность нейтрофилов крови привитых против чумы людей отвечать *in vitro* на контакт с убитыми клетками *Y. pestis* более интенсивной азурофильной дегрануляцией [5], связанной с высвобождением из гранул необходимых для образования НВЛ ферментов [34].

Выбор типа адаптивного иммунного ответа, регулируемого Т-лимфоцитами (Th1, Th2, Th17, Treg), зависит, согласно новым представлениям о противои-нфекционном иммунитете, от активации определенного набора рецепторов на поверхности фагоцитов. Имея несколько вариантов такой функциональной активации, фагоциты способствуют дифференцировке Т-лимфоцитов в разных направлениях [4], а также могут влиять на интенсивность адаптивного иммунного ответа. В частности, в работе Tillack K. et al. [44] убедительно доказано, что НВЛ оказывают на Т-лимфоциты прямой примиряющий эффект, приводящий к резкому снижению порога их активации при повторном взаимодействии со специфическими бактериальными антигенами.

Таким образом, проанализированные данные о наличии у возбудителей чумы, холеры и мелиоидоза механизмов защиты от бактерицидного эффекта НВЛ, а также об участии НВЛ в регуляции иммунного ответа и развитии сепсиса свидетельствуют о важности дальнейшего изучения роли НВЛ при ООБИ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Богачева Н.В., Крючков А.В., Дармов И.В., Воробьев К.А., Печенкин Д.В., Елагин Г.Д., Колесников Д.П. Экспериментальная оценка методом проточной цитофлуориметрии уровня клеточной иммунологической памяти у лиц, вакцинированных против чумы и сибирской язвы. *Клин. лаб. диагностика*. 2013, 11: 48-53.
2. Воробьева Н.В., Пинегин Б.В. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: механизмы образования, роль в норме и при патологии. *Биохимия*. 2014, 79 (12): 1580-91.
3. Долгушин И.И., Савочкина А.Ю., Курносенко И.В., Долгушина В.Ф., Савельев А.А., Самусева И.В., Маякова В.Б. Участие внеклеточных нейтрофильных ловушек в защитных и патологических реакциях организма. *Российский иммунологический журнал*. 2015, 9 (18), 2: 164-170.
4. Киселева Е.П. Новые представления о противои-нфекционном иммунитете. *Инфекция и иммунитет*. 2011, 1: 9-14.

5. Кравцов 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.
6. Кравцов А.Л. Формирование внеклеточных ловушек — эффективный механизм защиты от патогена. *Пробл. особо опасных инф.* 2012, 2 (112): 69-74.
7. Кутырев В.В., Коннов Н.П., Волков Ю.П. Возбудитель чумы: ультраструктура и локализация в переносчике. М., Медицина, 2007.
8. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Евлевский А.А. Нейтрофильные гранулоциты: новый взгляд на «старых игроков» на иммунологическом поле. *Иммунология.* 2015; 4: 257-65.
9. Семенов Б.Ф., Зверев В.В. Концепция быстрой иммунологической защиты от патогенов. *Журн. микробиол.* 2007, 4: 93-100.
10. Фрадкин В.А. Диагностика аллергии реакциями нейтрофилов крови. М., Медицина, 1985.
11. Beiter K., Wartha F., Albiger B. et al. An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr. Biology.* 2006, 16: 401-407.
12. Branzk N., Lubojemska A., Hardison S.E. et al. Neutrophil sense microbial size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat. Immunol.* 2014, 15 (11): 1017-1025.
13. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004, 303: 1532-1535.
14. Camicia G., Pozner R., Larranaga G. Neutrophil extracellular traps in sepsis. *Shock.* 2014, 42 (4): 286-294.
15. Casutt-Mayer S., Renzi F., Schmalzer M. et al. Oligomeric coiled-coil adhesin YadA is a double-edged sword. *PLoS ONE.* 2010, 5 (12): e15159. doi: 10.1371/journal.pone.0015159.
16. Chen G., Zhang D., Fuchs T.A. et al. Heme-induced neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of sickle cell disease. *Blood.* 2014, doi: 10.1182/blood-2013-10-529982.
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: 463-469.
18. Davey H.M., Kell D.B. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analysis. *Microbiol. Rev.* 1996, 60: 641-696.
19. de Jong H.K., Koh G., Achouiti A. et al. Neutrophil extracellular traps in the host defense against sepsis induced *Burkholderia pseudomallei* (melioidosis). *Intensive Care Medicine Experimental.* 2014, 2 (21). doi: 10.1186/s40635-014-0021-2.
20. Domenech M., Ramos-Sevillano E., Garcia E. et al. Biofilm formation avoids complements immunity and phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 2013, 81: 2606-2615.
21. Eisele N.A., Lee-Lewis H., Besch-Williford C. et al. Chemokine receptor CXCR2 mediates bacterial clearance rather than neutrophil recruitment in murine model of pneumonic plague. *Am. J. Pathol.* 2011, 178 (3): 1190-1200.
22. Fuchs T.A., Abed U., Goosmann C. et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 2007, 176: 231-241.
23. Fuchs T.A., Brill A., Duerschmied D. et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *PNAS.* 2010, 107 (36): www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1005743107.
24. Gupta A.K., Joshi M.B., 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.
25. Hickey M.J., Kubes P. Intravascular immunity: the host-pathogen encounter in blood vessels. *Nat. Rev. Immunology.* 2009, 9: 364-375.
26. Kravtsov A.L., Bobyleva E.V., Grebenyukova T.P., Kuznetsov O.S., Kulyash Y.V. Flow microfluorometric analysis of phagocyte degranulation in bacteria infected whole human blood cell cultures. *Proc. SPIE.* 2002, 4707: 395-402.
27. Landoni V.I., Chiarella P., Martire-Greco D. et al. Tolerance to lipopolysaccharide promotes an enhanced neutrophil extracellular trap formation leading to a more efficient bacterial clearance in mice. *Clin. and Exper. Immunol.* 2012, 168: 153-163.
28. Ma C.A., Kubes P.K. Platelets, neutrophils, and neutrophil extracellular traps in sepsis. *J. Thromb. Haemostasis.* 2008, 6 (3): 415-420.

29. Marcos V., Zhou Z., Yildirim A. et al. CXCR2 mediates NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation in cystic fibrosis airways inflammation. *Nat. Med.* 2010, 16: 1018-1023.
30. Mayer-School A., Hurwitz R., Brinkmann V. et al. Human neutrophils kill *Bacillus anthracis*. *PLoS Pathog.* 2005, 1 (3): e23. doi: 10.1371/journal.ppat.0010023.
31. McAdow M., Kim H.A., DeDent A.C. et al. Preventing *Staphylococcus aureus* sepsis through the inhibition of its agglutination in blood. *PLoS Pathog.* 2011, 7 (10): e1002307. doi: 10.1371/journal.ppat.1002307.
32. McDonald B., Urrutia R., Yipp B.G. et al. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from bloodstream during sepsis. *Cell Host Microbe.* 2012, 12 (3): 324-333.
33. Murphey E.D., Fang G., Varma T.K., Sherwood E.R. Improved bacterial clearance and decreased mortality can be induced by LPS tolerance and is not dependent upon IFN- γ . *Shock.* 2007, 27: 289-295.
34. Papayannopoulos V., Metzger K.D., Hakim A., Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 2010, 191: 677-691.
35. Prashar A., Bhatia S., Gigliozzi D. et al. Filamentous morphology of bacteria delays the timing of phagosome morphogenesis in macrophages. *J. Cell Biol.* 2013, 203: 1081-1097.
36. Riyara D., Buddhisa S., Korbsrisate S. et al. Neutrophil extracellular traps exhibit antibacterial activity against *Burkholderia pseudomallei* and are influenced by bacterial and host factors. *Infect. Immun.* 2012, 80 (11): 3921-3929.
37. Seper A., Hosseinzadeh A., Gorkiewicz G. et al. *Vibrio cholerae* evades neutrophil extracellular traps by the activity of two extracellular nucleases. *PLoS Pathog.* 2013, 9 (9): e1003614. doi: 10.1371/journal.ppat.1003614.
38. Seper A., F ngler V.H., Roier S. et al. Extracellular nucleases and extracellular DNA play important roles in *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Mol. Microbiol.* 2011, 82: 1015-1037.
39. Shannon J.G., Hasenkrug A.M., Dorward D.W. et al. *Yersinia pestis* subverts the dermal neutrophil response in mouse model of bubonic plague. *mBio.* 2013, 4 (5): e00170-13. doi: 10.1128/mBio.00170-13.
40. Silva T.M. Bacteria-induced phagocyte secondary necrosis as a pathogenicity mechanism. *J. Leuk. Biology.* 2010, 88 (5): 885-896.
41. Simpson A.J. Melioidosis: a clinical model for gram-negative sepsis. *J. Med. Microbiology.* 2001, 50 (8): 657-658.
42. Tanaka K., Koike Y., Shimura T. et al. In vivo characterization of neutrophil extracellular traps in various organs of a murine sepsis model. *PLoS One.* 2014, 9 (11): e111888. doi: 10.1371/journal.pone.0111888.
43. Tang A.H., Brunn G.J., Cascalho M., Platt J.L. Pivotal advance: endogenous pathway to SIRS, sepsis, and related conditions. *J. Leuk. Biology.* 2007, 82: 282-285.
44. Tillack K., Breiden P., Martin R., Sospedra M. T-lymphocyte priming by neutrophil extracellular traps links innate and adaptive immune responses. *J. Immunology.* 2012, 188 (7): 3150-3159.
45. Weinrauch Y., Drujan D., Shapiro S.D. et al. Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. *Nature.* 2002, 417: 91-94.
46. Yoong P., Cywes-Bentley C., Pier G.B. Poly-N-Acetylglucosamine expression by wild-type *Yersinia pestis* is maximal at mammalian, not flea, temperatures. *mBio.* 2012, 3(4). E00217-12. Doi: 10.1128/mBio.00217-12.

Поступила 20.02.16

Контактная информация: Кравцов Александр Леонидович, д.б.н.
410005, Саратов, ул. Университетская, 46, р.т. (8452)26-21-31