

М.Д. Перова и М.Г. Шубич

ОТКРЫТИЕ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК – НОВЫЙ ЭТАП В ИЗУЧЕНИИ МОРФОГЕНЕЗА И ФУНКЦИЙ НЕЙТРОФИЛОВ

Кубанский государственный медицинский университет, г. Краснодар; Краснодарский Центр пародонтологии и дентальной имплантации (руков. — проф. М.Д. Перова), e-mail: kav@mail.kuban.ru, corpus@kgma.ru

Цель настоящего обзора — дать анализ накопленным фактам о недавно открытом новом защитном свойстве нейтрофилов — способности образовывать внеклеточные нейтрофильные ловушки — NETs. Контакт с патогенными микробами и/или воздействие провоспалительных цитокинов запускает в нейтрофилах респираторный взрыв с последующей инициацией клеточной гибели (нэтоз), которая отличается от апоптоза и некроза. NETs образованы выброшенными из нейтрофила фибриллами деконденсированного хроматина (ДНК/гистоны), который тесно ассоциирован с антимикробными белками цитоплазматических гранул. Благодаря своей трёхмерной структуре NETs способны фиксировать микроорганизмы (бактерии, грибы, простейшие), а высокая локальная концентрация антимикробных веществ обеспечивает их уничтожение. В обзоре приведены сведения о защитной роли NETs при инфекционных заболеваниях, травмах и хирургических вмешательствах, а также в ранней фазе репаративного процесса. Принимая во внимание, что нейтрофилы участвуют в ориентации иммунного ответа посредством пентраксина-3 (РТХ3), в том числе в переключении на адаптивный иммунный ответ, необходимо изучение последующих взаимодействий внеклеточных ДНК-гистоновых структур с тканевым микроокружением.

Ключевые слова: *нейтрофильные гранулоциты, внеклеточные нейтрофильные ловушки (NETs)*

Открытие V. Brinkmann и соавт. в 2004 г. нейтрофильных внеклеточных ловушек (neutrophil extracellular traps, NETs) и установление их антимикробного эффекта, как важнейшего звена врожденного иммунитета [22], безусловно, является началом нового этапа в понимании жизненного цикла и функции нейтрофилов. Уже появились десятки научных работ по этой проблеме. Обзорение главных из них является предметом данной статьи. К сожалению, в новом издании авторитетного руководства по иммунобиологии [53] нет упоминания о NETs.

Открытие И.И. Мечниковым фагоцитоза в 1882 г. сделано в ходе прижизненного микроскопического изучения прозрачных форм низших беспозвоночных, выловленных у берегов Сицилии. И.И. Мечников обнаружил поглощение и переваривание блуждающими амебоидными клетками бактерий, спонтанно появляющихся в ранах у этих животных, и бактерий, внесенных экспериментально [7, 8]. В результате этих наблюдений мысль И.И. Мечникова была направлена к патологии человека [3], и он в 1883 г. в своей первой публикации по этой проблеме [7] и в историческом докладе на VII съезде русских естествоиспытателей и врачей [9, 14] сформулировал теорию о целебных силах организма, реализуемых системой фагоцитов, которые обеспечивают защиту организма от бактерий. В своих вскоре последовавших гистологических исследовани-

ях И.И. Мечников обнаружил в соединительной ткани кожи людей, погибших от рожистого воспаления, крупные фагоцитирующие клетки, способные поглощать целые лейкоциты, клеточные фрагменты, а иногда и другие посторонние тельца. Эти клетки И.И. Мечников назвал макрофагами в отличие от микрофагов — мелких лейкоцитов с сегментоядерным ядром. При рожистом воспалении макрофаги не поглощают стрептококки, тогда как активный фагоцитоз этих бактерий осуществляется исключительно микрофагами. Таким образом, И.И. Мечниковым была установлена важнейшая роль фагоцитирующих нейтрофилов в защите организма от микробов [11]. Вместе с тем, при экспериментальной сибиреязвенной инфекции млекопитающих И.И. Мечников наблюдал процесс фагоцитоза возбудителя болезни макрофагами [10].

Вторым защитным механизмом нейтрофилов является выделение содержимого гранул во внеклеточное пространство [4, 5, 36]. Этому процессу до сих пор уделяется значительно меньше внимания, чем фагоцитозу [5, 6, 53].

Нейтрофилы, как важнейшие клетки врожденного иммунитета, обеспечивают наиболее быстрые защитные реакции в ответ на проникновение в организм различных микробных патогенов (МПП) [6, 54]. В процессе нормального кроветворения, независимо от контакта с микроорганизмами, в нейтрофилах к моменту их появ-

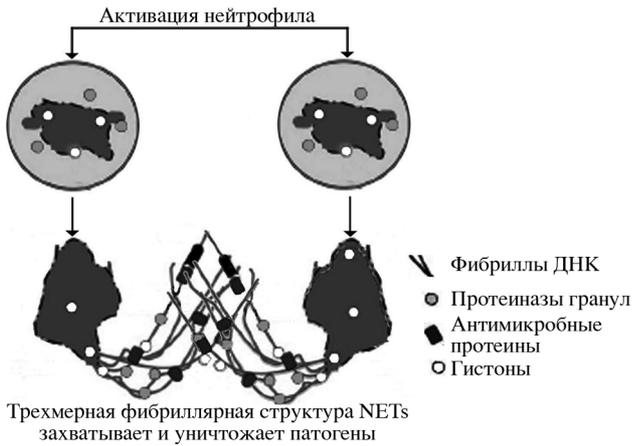


Схема образования внеклеточной нейтрофильной ловушки (NETs) (по M. von Köckritz-Blickwede и V. Nizet, [44] с изменениями и дополнениями).

ления в кровотоке количество противомикробных белков становится достаточным для эффективного участия в уничтожении МПГ [14, 19, 39, 61]. Нейтрофилы, проникшие в инфицированную ткань, активируются вторгшимися МПГ и захватывают их после предварительной опсонизации своей плазмолеммой с последующим переносом в фагосому. Далее фагосомы, сливаясь с первичными (азурофильными), вторичными (специфическими) и третичными гранулами, формируют фаголизосому [35, 60], в пределах которой уничтожение МПГ достигается комбинацией неокислительных и кислородзависимых механизмов [4, 54, 62, 64].

Внемитохондриальное образование противомикробных активных форм кислорода (АФК) — «респираторный взрыв» происходит с участием комплекса NADPH-оксидазы, связанного с плазмолеммой нейтрофила. После стимуляции МПГ и/или провоспалительными цитокинами синтезированные ранее компоненты NADPH-оксидазы собираются на мембране фагосомы и передают электроны кислороду для образования АФК (O_2^- , H_2O_2 , $HOCl$), которые являются мощным цитотоксическим оружием нейтрофилов и обладают сильно выраженной способностью разрушать МПГ [4, 6, 42, 45, 54].

Еще V. Brinkmann и соавт. [22], используя нейтрофилы человека из очищенной фракции этих клеток, с помощью сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии (СЭМ и ТЭМ) выяснили, что покоящиеся клетки, сохраняя компактность и имея округлые очертания с редкими неглубокими складками плазмолеммы, при стимуляции *in vitro* липополисахаридом, форболмиристатацетатом или интерлейкином-8 уплощаются и формируют довольно длинные выпячивания.

Теряя в процессе стимуляции свою прежнюю форму, нейтрофилы в течение небольшого времени образуют в цитоплазме структуру из компонентов ядра и гранул, которая в виде рельефных фибрилл выбрасывается во внеклеточное пространство (рисунок). Высокорастворяющая СЭМ показывает, что ее отдельные гладкие фибриллы имеют диаметр 15–17 нм, а их глобулярные домены — около 25 нм. Встречаются и более толстые фибриллы, диаметром до 50 нм, которые образуются путем агрегации тонких. Изучение ультратонких поперечных срезов с помощью ТЭМ показало, что как тонкие, так и толстые фибриллы мембраной не окружены. Фибриллы в ловушках весьма ломки, и их лабораторное выявление требует аккуратной отмывки и фиксации препаратов с целью сохранения NETs. Методом конфокальной иммунофлуоресцентной цитохимии (КИФЦ) в работе V. Brinkmann и соавт. [22] установлено, что главным компонентом фибрилл ловушек является ДНК, которая интенсивно окрашивается интеркалирующими (встраивающимися в ДНК) красителями. Даже кратковременное воздействие дезоксирибонуклеазы приводит к дезинтеграции фибрилл NETs, в противоположность протеазам, которые оставляют ДНК ловушки интактной. С помощью ТЭМ ультратонких криосрезов, подвергнутых двойному иммуноокрашиванию, было уточнено нахождение нейтрофильной эластазы и ДНК-гистоновых комплексов (H2A-H2B-DNA) на глобулярных доменах NETs [22]. Кроме того, локализация нейтрофильной эластазы определена авторами при проведении СЭМ с предварительным иммуноокрашиванием. В зоне связывания этого фермента обнаружено наибольшее количество рассеянных электронов, отраженных от наночастиц напыленного золота. С помощью КИФЦ также было показано, что в составе NETs содержатся белки из первичных гранул, где, кроме нейтрофильной эластазы, определяются катепсин G и миелопероксидаза, а из содержимого вторичных и третичных гранул в состав NETs входят лактоферрин и желатиназа соответственно [22, 58].

V. Brinkmann и соавт. [22] высказали мысль, что нейтрофилы формируют ловушки активно. Их собственные данные свидетельствуют, во-первых, об отсутствии в составе NETs цитоплазматического маркера нейтрофилов — лактатдегидрогеназы и способности нейтрофилов не реагировать с витальными красителями, по крайней мере, в течение 2 ч после стимуляции. Во-вторых, об этом говорит и то, что предварительная инкубация нейтрофилов с интеркалирующими (встраивающимися в молекулы ДНК) кра-

сителями перед началом активации этих клеток препятствует образованию NETs, но не влияет на индукцию апоптоза стауропоорином или фактором некроза опухолей альфа (TNF α). В-третьих, цейтраферная видеомикроскопия подтверждает, что только подвижные, активированные нейтрофилы могут формировать NETs.

Итак, приведенные данные однозначно свидетельствуют о том, что образование нейтрофильных внеклеточных ловушек происходит активно, а не как следствие пассивного выхода клеточных компонентов в результате разрушения клеток.

Подтверждая и уточняя данные V. Brinkmann и соавт. [22], в последующих исследованиях наблюдались потеря активированными нейтрофилами классической формы ядер, гомогенизация эу- и гетерохроматина с последующей дезинтеграцией оболочки ядра и мембран цитоплазматических гранул [23, 28, 31]. Такие изменения создают условия для внутриклеточного связывания хроматина (ДНК-гистонового комплекса) с антибактериальными белками первичных, вторичных и третичных гранул нейтрофилов.

Также было выяснено, что в противомикробном действии NETs принимают участие и гистоны хроматина. Очищенный H2A в концентрации 2 мг/мл (140 наномоль) уничтожает за 30 мин *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi murium* в культуре. Эта концентрация значительно меньше требуемой концентрации антибактериальных белков нейтрофилов для такого же эффекта [22, 27].

V. Brinkmann и соавт. предположили, что внутриклеточное образование NETs — это ранний признак начала процесса, приводящего к гибели нейтрофилов, подвергшихся стимуляции. Для изучения морфологических изменений, приводящих к смерти клетки и образованию NETs, были проведены исследования [23, 31], в ходе которых нейтрофилы фиксировали в разные отрезки времени после воздействия PMA и анализировали с помощью ТЭМ и КИФЦ [31]. Вскоре после стимуляции ядра начинали терять свои фрагменты, а хроматин деконденсироваться, причем пространство между внутренней и наружной ядерными мембранами расширилось с $18,8 \pm 3,9$ до $27,9 \pm 5,8$ нм. Затем из внутренней ядерной мембраны, как было определено с использованием рецептора ламина В и иммунофлюоресцентного окрашивания, белки оболочки ядра формируют отчетливо видимые пузырьки, оболочка ядра полностью дезинтегрируется, а наибольшая часть гранул исчезают. С деструкцией оболочки ядра и мембран гранул фибриллы деконденсированного хроматина оказываются в прямом контакте с

компонентами гранул, при этом маркер нейтрофильной эластазы солюкализуется с хроматином. Авторами отмечено, что целостность плазмолеммы стимулированных нейтрофилов не определяется разрывом мембран цитоплазматических гранул, что подтверждает внутриклеточное соединение компонентов NETs [23, 31].

Недавно было выяснено, что биохимической предпосылкой к изменению состояния хроматина в ядрах нейтрофилов, сопровождающемуся деструкцией оболочки ядра, является экспрессия нейтрофилами высоких уровней пептидиларгининдезаминазы-4, которая катализирует цитруллинирование гистонов [67]. В работе показано, что именно этот процесс приводит к деконденсации хроматина с последующим биохимическим соединением ДНК-гистонового комплекса и белков гранул, в результате чего образуются рельефные фибриллярные структуры NETs.

В ответ на последовательную стимуляцию *in vitro* компонентом комплемента (C5a) различных по степени дифференцировки нейтрофилов человека было показано, что лишь сегментоядерные клетки принимают участие в образовании NETs [50, 55].

Процесс гибели нейтрофилов, завершающийся образованием NETs [23], получил название нэтоза (NETosis). Этот термин сейчас широко используется в литературе [28, 31, 44]. После открытия NETs способность к формированию внеклеточных ловушек была обнаружена у тучных клеток и у эозинофильных гранулоцитов. В связи с этим возникли термины — внеклеточные ловушки (ETs, extracellular traps) и этоз (ETosis), как обобщающие обозначения для любых внеклеточных ловушек и процесса их образования [22, 32].

Морфологически нэтоз резко отличается от видов клеточной гибели путем апоптоза и некроза. Известно, что для апоптоза нейтрофилов, как естественного процесса гибели этих клеток в завершение своего жизненного цикла или при слабой стимуляции МПГ, характерны конденсация хроматина с фрагментацией ДНК без повреждения оболочки ядра и вакуолизация цитоплазмы при сохранении гранул интактными [29]. При некрозе нейтрофилов, вызванном особенно сильным воздействием микробных токсинов, ядра теряют сегментированную форму, их фрагменты сливаются с образованием гомогенной массы без разделения на эу- и гетерохроматин, но оболочка ядра сохраняется; структура органелл так же, как и при апоптозе, не затрагивается. Таким образом, морфологические изменения нейтрофилов при ранее известных видах клеточной гибели прин-

ципально отличаются от нэтоза, как процесса, при котором оболочка ядра дезинтегрируется, происходит растворение гранул, а их компоненты и структуры хроматина объединяются, формируя при этом NETs, выбрасываемые во внеклеточное пространство [23].

Важнейшим сигналом для формирования NETs, как и для деградации микробов при фагоцитозе, являются АФК, которые запускают потерю сегментации ядер нейтрофилов, сопровождающуюся однородным распределением хроматина, что рассматривается как иницирующий момент в формировании NETs. Выделяют 3 важных шага в процессе образования NETs: 1) продуцирование АФК; 2) начало нэтоза и 3) формирование NETs с последующим выбросом их за пределы клетки. Показано, что нейтрофилы линий мышей, генетически дефицитных по NADPH-оксидазе, лишенной субъединицы gp91, не продуцируют АФК и при стимуляции не формируют NETs. Стимулированные нейтрофилы различных линий мышей образуют не одинаковое количество NETs, коррелирующее с интенсивностью продукции АФК [28]. Соответственно этому нейтрофилы, выделенные у больных с хронической гранулематозной болезнью, несущие мутации NADPH-оксидазы, и в связи с чем они не продуцируют АФК, также лишены способности формировать NETs [31]. У таких больных развивается тяжелый иммунодефицит, сопровождающийся оппортунистическими рецидивирующими инфекциями. Между тем, отмечено, что активность NADPH-оксидазы в нейтрофилах новорожденных эквивалентна таковой у взрослого организма, хотя образования NETs у этих детей не происходит [43, 70]. Таким образом, АФК являются необходимыми, но не достаточными сигнальными молекулами для образования NETs. По-видимому, существуют дополнительные молекулярные сигналы для формирования NETs и объяснения механизмов неполноценности нейтрофилов у новорожденных.

В своей основополагающей работе V. Brinkmann и соавт., инкубируя фракцию стимулированных нейтрофилов с цитохалазином D и микробами, отметили, что после образования NETs около 30% инокулированных *Shigella flexneri* и *Staphylococcus aureus* были уничтожены, несмотря на подавление функции фагоцитоза [22]. Иными словами, в присутствии цитохалазина D наблюдаются блокада фагоцитоза и персистенция функционирующих NETs. В присутствии ДНКазы NETs разрушаются, а уничтожение МПГ происходит только путем фагоцитоза. Таким образом, в отсутствие ДНКазы

нейтрофилы могут уничтожать микробы двояко: и фагоцитозом, и путем действия NETs.

С помощью КИФЦ и СЭМ было показано, что фиксированные в фибриллах NETs грамположительные (*Staphylococcus aureus*) и грамотрицательные патогенные бактерии (*Salmonella typhi murium*, *Shigella flexneri*) подвергаются разрушению [22]. Этот эффект, по мнению авторов, в основном обусловлен действием нейтрофильной эластазы. Такой взгляд находит подтверждение в том, что выделенная из клеток и очищенная нейтрофильная эластаза, так же как и эластаза другого происхождения [69], подавляет факторы вирулентности *Shigella flexneri*, которые обеспечивают диссеминацию этого МПГ (IcsA) и его проникновение внутрь клеток макроорганизма путем образования в них пор (IpaB). Фибриллярная структура NETs необходима для захвата и фиксации микроорганизмов, подавление факторов вирулентности и их деградация обусловлены воздействием высокой локальной концентрации антибактериальных агентов на связанные в ловушке МПГ.

Такие МПГ, как *Salmonella typhi murium*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, задерживаются и уничтожаются в ловушках [22]. Однако некоторые резистентные штаммы бактерий не подвержены действию NETs благодаря продукции эндогенной ДНКазы [63], которая экспрессируется грамположительными МПГ [59], но роль её в резистентности микробов была непонятна, пока K. Veiter и соавт. не показали, что поверхностная эндонуклеаза А штамма *Streptococcus pneumoniae* увеличивает резистентность этой бактерии посредством разрушения остова ДНК ловушек [18]. Было уточнено, что ДНКазы ингибируют позднюю стадию продукции АФК в нейтрофилах [52]. Для ингибирования АФК бактерии могут также использовать каталазу [68]. Кроме того, некоторые МПГ, например *Haemophilus influenzae*, недоступны для действия NETs, поскольку они, размножаясь, формируют обширные агрегаты в виде биопленки [37]. Несмотря на плохо понятные сегодня молекулярные механизмы захвата микробов в ловушки, рассматривается участие в этом процессе электростатических взаимодействий между катионными компонентами NETs и отрицательно заряженной поверхностью бактерий [23].

Недавно появились сведения, что NETs играют защитную роль при небактериальных инфекционных заболеваниях, таких как кожный лейшманиоз [33] и тропическая малярия [17], вызываемых протозойными патогенами, которые не могут быть элиминированы путем фагоцитоза.

Условно-патогенные диморфные грибы весьма чувствительны к воздействию NETs человека [65]. D. Ermert и соавт. проверили способность *Candida albicans* активировать нейтрофилы мыши, вплоть до образования NETs [28]. При раздельной инкубации бластоспор и псевдомицелия *Candida albicans* в соотношении 1:2 было установлено, что обе формы гриба вызывают продукцию АФК. Однако в случае с гифами псевдомицелия уровень продукции АФК был в 20 раз выше и наблюдался более выраженный фунгицидный эффект за счет образования многочисленных NETs.

NETs изобилуют в зонах воспаления, что было показано при экспериментальной дизентерии, в образцах тканей человека при спонтанном аппендиците [22], в случае со стрептококковой инфекцией при гнойном воспалении мягких тканей [18, 24], ряде аутоиммунных болезней, в частности, при развитии васкулитов мелких сосудов [30, 41], а также при преэклампсии, характеризующейся высоким содержанием циркулирующей ДНК в периферической крови в связи с захватом провоспалительных микрочастиц синцитиотрофобласта в NETs [34].

Образование NETs продемонстрировано в микроциркуляторном русле легких при острой пневмонии и сепсисе. В гистологических препаратах легкого у таких больных агрегаты NETs идентифицируются авторами в просветах капилляров как гематоксилин-позитивные структуры. При этом, представлены данные о связывании в кровотоке адгезированных на эндотелии нейтрофилов с тромбоцитами, активированными их TLR4-рецепторами. Это связывание приводит к мощной стимуляции нейтрофилов и образованию NETs. Кроме того, отмечена значительная устойчивость внеклеточных фибриллярных структур к разрушению в кровотоке. Наибольшая способность NETs к захвату микроорганизмов в пределах кровеносного русла с его последующей окклюзией отмечена, главным образом, в синусоидах печени и, как уже указывалось, в легочных капиллярах [25]. Высокая концентрация ДНК в циркулирующей крови, наблюдающаяся при системном воспалительном ответе, множественной травме, ожоговых повреждениях или после сложных хирургических вмешательств, рассматривается как проявление присутствия большого количества внутрисосудистых NETs и признаётся сигналом для проведения интенсивной терапии [49].

При воспалительно-деструктивном процессе в тканях пародонта NETs постоянно присутствуют в гнойном экссудате зубодесневых карманов [66]. В раннем периоде (первые 2 сут) после хирургического лечения пародонтита на фоне сплошной

инфильтрации зоны регенерации сегментированными нейтрофилами в цитологическом исследовании зарегистрировано образование агрегатов NETs в комбинации с рядом других морфологических изменений нейтрофилов [13].

Способность к образованию NETs широко распространена и у животных: у кроликов [22], мышей [18, 24, 28], лошадей [15], коров [46] и рыб [57].

Новую страницу в рассматриваемой здесь проблеме открывает работа S. Jaillon и соавт. [39], в которой впервые было обнаружено присутствие пентраксина-3 (PTX3) как в NETs, так и в нестимулированных сегментоядерных нейтрофилах циркулирующей крови. В этой работе путем сочетания методик субклеточного фракционирования и КИФЦ была установлена преимущественная солокализация PTX3 ($72,22 \pm 7,32\%$) с лактоферрином — маркером вторичных гранул и лишь частичная ($27,8 \pm 8,73\%$) с желатиназой — постоянным компонентом третичных гранул. В первичных гранулах PTX3 выявляется весьма редко ($5,9 \pm 2,21\%$), а на поверхности нейтрофилов он и вовсе отсутствует. Помимо этого, S. Jaillon и соавт. подтвердили более ранние данные [16, 47] о том, что синтез PTX3 происходит в ходе нормального гранулопоэза согласно четкой временной иерархии, начиная со стадии промиелоцита, тогда как лишь в сегментоядерных нейтрофилах костного мозга присутствует зрелый белок PTX3.

PTX3 является жидкофазным протеином, которому присущи свойства паттерн-распознающих рецепторов (англ. pattern recognition receptors, PRRs). Наиболее известные из них Toll-подобные рецепторы (англ. Toll-like receptors, TLRs) присутствуют в мембранах эффекторных клеток врожденного иммунитета — макрофагов и нейтрофилов. Как жидкофазные, так и мембранные формы PRRs распознают поверхностные молекулы, экспрессируемые подавляющим большинством известных МПГ, способствуя, тем самым, их последующей деградации [1, 2, 12, 51, 53]. Как показывают модельные опыты [39, 40], инкубация нестимулированных нейтрофилов человека с МПГ приводит к значительному экзоцитозу PTX3 уже через 1–2 ч при максимуме 4–16 ч. При этом около 25% выделившегося из нейтрофилов PTX3 связывается с NETs. Макрофаги и дендритные клетки приступают к выделению PTX3 гораздо позже, через 1–2 сут [26].

В связи с отсутствием данных об участии PTX3 во внутриклеточном образовании NETs приходится полагать, что наличие в составе NETs этого протеина обусловлено связыванием PTX3, выделившегося из нейтрофилов, с фибриллами

ДНК-гистонового комплекса NETs или с фиксированными на них МПГ. Структуры сформированной ловушки концентрируют и фокусируют действие RTX3 на МПГ [15, 36].

Механизмы воздействия RTX3 как один из PRRs на МПГ описаны в источниках, указанных выше. Здесь мы отметим лишь способность RTX3, как и других жидкофазных PRRs, например, С-реактивного белка плазмы крови, опсонизировать МПГ двумя путями: непосредственным связыванием с МПГ и/или в результате активации системы комплемента, наступающей после реакции RTX3 с её C1q-компонентом [20, 21, 38, 48, 55].

Принимая во внимание обилие нейтрофилов в циркулирующей крови и после их эмиграции в соединительную ткань в острой фазе воспаления, следует признать, что именно нейтрофилы являются главными источниками RTX3 в этот период. Так как RTX3, как и другие PRRs, оказывает значительное антибактериальное и фунгицидное действие на широкий спектр МПГ [32], он как бы предваряет эффект многих антител адаптивного иммунитета, поскольку каждое из них воздействует только на один избранный антиген и дает свой эффект значительно позже, чем такие эффекторы врожденного иммунитета, как нейтрофилы и NETs [20, 21, 56]. RTX3, быстро выделяемый нейтрофилами, участвует в ориентации адаптивного иммунного ответа, направляя его в сторону образования Th1-лимфоцитов [20, 21, 32], что конкретизирует известное положение об участии нейтрофилов в специфических иммунных реакциях [4, 53]. Поэтому RTX3, как типичный жидкофазный паттерн-распознающий рецептор, квалифицируются рядом авторов как функциональный аналог антител (англ. *ante-antibodies*) [16, 20, 48].

В целом, приведенные данные свидетельствуют о том, что белки гранул нейтрофилов и компоненты их хроматина совместно образуют внеклеточные структуры, которые, обеспечивая высокую локальную концентрацию антибактериальных, противопаразитарных и фунгицидных веществ, усиливают эффективность защитной функции нейтрофилов.

Изложенные в обзоре сведения показывают, что в научной литературе до сих пор отсутствует сравнительная оценка мощности защитного ответа нейтрофилов путем фагоцитоза и в результате захвата МПГ в NETs. Возможно, получение таких данных сделает более понятными механизмы патогенеза ряда болезней и подходы к их эффективному лечению. Пока не ясна дальнейшая судьба этих внеклеточных структур — фибрилл NETs с основой из ДНК-гистонов. Нет ответа и

на вопрос, все ли нейтрофилы способны образовывать NETs или существуют их субпопуляции. Вместе с тем, вполне очевидно, что накопленные в последнее десятилетие факты и рассмотренные в настоящем обзоре данные свидетельствуют о начале новой эры в изучении морфогенеза и функции «вездесущих», по И.И. Мечникову [7], клеток — нейтрофилов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авдеева М.Г., Лебедев В.В. и Шубич М.Г. Новые молекулярные механизмы развития инфекционного процесса. *Клин. лаб. диагностика*, 2007, № 4, с. 12–22.
2. Авдеева М.Г. и Шубич М.Г. Патогенетические механизмы инициации синдрома системного воспалительного ответа (обзор литературы). *Клин. лаб. диагностика*, 2003, № 6, с. 3–9.
3. Безредка А.М. История одной идеи. Творчество Мечникова. Харьков, Научная мысль, 1926.
4. Быков В.Л. Цитология и общая гистология (функциональная морфология клеток и тканей человека). СПб., СОТИС, 2001.
5. Коротяев А.И. и Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология. 4-е изд. СПб., СпецЛит, 2008.
6. Маянский А.Н. и Маянский Д.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. Новосибирск, Наука, 1983.
7. Мечников И.И. Лекции о сравнительной патологии воспаления. М., Гос. изд-во мед. лит-ры, 1947.
8. Мечников И.И. Исследования о внутриклеточном пищеварении у беспозвоночных. В кн.: *Акад. собр. соч.*, т. 6. М., Изд-во АН СССР, 1952, с. 3–21.
9. Мечников И.И. О целебных свойствах организма. Там же, с. 22–29.
10. Мечников И.И. Об отношении фагоцитов к бациллам сибирской язвы. Там же, с. 41–59.
11. Мечников И.И. О борьбе клеток против рожистого стрептококка. Там же, с. 63–90.
12. Перова М.Д. и Шубич М.Г. Молекулярные аспекты инициации и развития воспалительно-деструктивных заболеваний пародонта. *Арх. пат.*, 2006, т. 68, № 5, с. 59–63.
13. Перова М.Д., Шубич М.Г., Козлов В.А. и Тропина А.В. Результаты ауто трансплантации васкулярно-стромальноклеточной фракции при пародонтите и особенности формирования тканевого регенерата. *Институт стоматологии*, 2010, т. 42, № 2, с. 62–64.
14. Шубич М.Г. и Тивкова И.В. Фагоцитарная революция в медицине (к 100-летию присуждения И.И. Мечникову Нобелевской премии, 1908 г.). *Морфология*, 2009, т. 135, вып. 1, с. 70–75.
15. Alghamdi A.S. and Foster D.N. Seminal DNase frees spermatozoa entangled in neutrophil extracellular traps. *Biol. Reprod.*, 2005, v. 73, p. 1174–1181.
16. Alles V., Bottazzi B., Peri G. et al. Inducible expression of RTX3, a new member of the pentraxin family, in human mononuclear phagocytes. *Blood*, 1994, v. 84, p. 3483–3493.
17. 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, v. 7, p. 41–46.

18. Beiter K., Wartha F., Albiger B. et al. An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr. Biol.*, 2006, v. 16, p. 401–407.
19. Borregaard N. and Cowland J.B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*, 1997, v. 89, p. 3503–3521.
20. Bottazzi B., Doni A., Garlanda C. and Mantovani A. An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm. *Annu. Rev. Immunol.*, 2010, v. 8, p. 157–183.
21. Bottazzi B., Garlanda C., Cotena A. et al. The long pentraxin PTX3 as a prototypic humoral pattern recognition receptor: interplay with cellular innate immunity. *Immunol. Rev.*, 2009, v. 227, p. 9–18.
22. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 2004, v. 303, p. 1532–1535.
23. Brinkmann V. and Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2007, v. 5, p. 577–582.
24. 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, v. 16, p. 396–400.
25. 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, v. 13, p. 463–469.
26. Doni A., Peri G., Chieppa M. et al. Production of the soluble pattern recognition receptor PTX3 by myeloid, but not plasmacytoid, dendritic cells. *Eur. J. Immunol.*, 2003, v. 33, p. 2886–2893.
27. Elsbach P., Weiss J. and Levy O. Integration of antimicrobial host defenses: role of the bactericidal/permeability-increasing protein. *Trends Microbiol.*, 1994, v. 2, p. 324–328.
28. Ermert D., Urban C.F., Laube B. et al. Mouse neutrophil extracellular traps in microbial infections. *J. Innate Immun.*, 2009, v. 1, p. 181–193.
29. Fadeel B., Ahlin A., Henter J. et al. Involvement of caspases in neutrophil apoptosis: regulation by reactive oxygen species. *Blood*, 1998, v. 92, p. 4808–4818.
30. Fairhurst A.M., Wandstrat A.E. and Wakeland E.K. Systemic lupus erythematosus: multiple immunological phenotypes in a complex genetic disease. *Adv. Immunol.*, 2006, v. 92, p. 59–69.
31. Fuchs T.A., Abed U., Goosmann C. et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.*, 2007, v. 176, p. 231–241.
32. Garlanda C., Hirsch E., Bozza S. et al. Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. *Nature*, 2002, v. 420, p. 182–186.
33. 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, v. 106, p. 6748–6753.
34. Gupta A.K., Hasler P., Holzgreve W. et al. Induction of neutrophil extracellular DNA lattices by placental microparticles and IL-8 and their presence in preeclampsia. *Hum. Immunol.*, 2005, v. 66, p. 1146–1154.
35. Hampton M., Kettle A. and Winterbourn C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*, 1998, v. 92, p. 3007–3017.
36. Henson P.E., Henson J.E., Fittschen C. et al. Degranulation and secretion by phagocytic cell. In: *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. 2nd ed. N.Y., Raven Press, 1992, p. 511–539.
37. Hong W., Juneau R.A., Pang B. and Swords W.E. Survival of bacterial biofilms within neutrophil extracellular traps promotes nontypeable *Haemophilus influenzae* persistence in the chinchilla model for otitis media. *J. Innate Immun.*, 2009, v. 1, p. 215–224.
38. Inforzato A., Peri G., Doni A. et al. Structure and function of the long pentraxin PTX3 glycosidic moiety: fine-tuning of the interaction with C1q and complement activation. *Biochemistry*, 2009, v. 45, p. 11540–11551.
39. Jaillon S., Peri G., Delneste Y. et al. The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. *J. Exp. Med.*, 2007, v. 204, p. 793–804.
40. Jeannin P., Bottazzi B., Sironi M. et al. Complexity and complementarity of outer membrane protein A recognition by cellular and humoral innate immunity receptors. *Immunity*, 2005, v. 22, p. 551–560.
41. Kessenbrock K., Krumbholz M., Schönemarker U. et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2009, v. 15, p. 623–625.
42. Klebanoff S.J. Oxygen metabolites from phagocytes. In *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. 3rd ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 1999, p. 721–768.
43. Koenig J.M. and Yoder M.C. Neonatal neutrophils: the good, the bad, and the ugly. *Clin. Perinatol.*, 2004, v. 31, p. 39–51.
44. Köckritz-Blickwede M. von and Nizet V. Innate immunity turned inside-out: antimicrobial defense by phagocyte extracellular traps. *J. Mol. Med.*, 2009, v. 87, p. 775–783.
45. Lambeth J.D. Nox enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev.*, 2004, v. 4, p. 181–189.
46. Lippolis J.D., Reinhardt T.A., Goff J.P. and Horst R.L. Neutrophil extracellular trap formation by bovine neutrophils is not inhibited by milk. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2006, v. 113, p. 248–255.
47. Lominadze G., Powell D.W., Luerman G.C. et al. Proteomic analysis of human neutrophil granules. *Mol. Cell. Proteomics*, 2005, v. 4, p. 1503–1521.
48. Mantovani A., Garlanda C., Doni A. and Bottazzi B. Pentraxins in innate immunity: from C-reactive protein to the long pentraxin PTX3. *J. Clin. Immunol.*, 2008, v. 28, p. 1–13.
49. Margraf S., Logters T., Reipen J. et al. Neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs): a potential prognostic marker for posttraumatic development of inflammatory second hit and sepsis. *Shock*, 2008, v. 30, p. 352–358.
50. Martinelli S., Urosevic M., Daryadel A. et al. Induction of genes mediating interferon-dependent extracellular trap formation during neutrophil differentiation. *J. Biol. Chem.*, 2004, v. 279, p. 44123–44132.
51. Medzhitov R., Preston-Hurlburt P. and Janeway C.A. Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 1997, v. 388, p. 394–405.
52. Munafo D.B., Johnson J.L., Brzezinska A.A. et al. DNase I inhibits a late phase of reactive oxygen species production in neutrophils. *J. Innate Immun.*, 2009, v. 6, p. 527–542.
53. Murphy K., Travers P. and Walport M. *Janeway's Immunobiology*. 7th ed., N.Y., Garland Science, 2008.
54. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.*, 2006, v. 6, p. 173–182.

55. Nauta A.J., Daha M.R., van Kooten C. and Roos A. Recognition and clearance of apoptotic cells: a role for complement and pentraxins. *Trends Immunol.*, 2003, v. 24, p. 148–154.
56. Nimmerjahn F. and Ravetch J.V. Anti-inflammatory actions of intravenous immunoglobulin. *Annu. Rev. Immunol.*, 2008, v. 26, p. 513–533.
57. Palic D., Andreassen C.B., Ostojic J. et al. Zebrafish (*Danio rerio*) whole kidney assays to measure neutrophil extracellular trap release and degranulation of primary granules. *J. Immunol. Methods*, 2007, v. 319, p. 87–97.
58. Pattison D.I. and Davies M.J. Reactions of myeloperoxidase-derived oxidants with biological substrates: gaining chemical insight into human inflammatory diseases. *Curr. Med. Chem.*, 2006, v. 13, p. 3271–3290.
59. Puyet A., Greenberg B. and Lacks S.A. Genetic and structural characterization of end A. A membrane bound nuclease required for transformation of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Mol. Biol.*, 1990, v. 213, p. 727–738.
60. Segal A. How neutrophils kill microbes. *Annu. Rev. Immunol.*, 2005, v. 23, p. 197–223.
61. Sengelov H., Follin P., Kjeldsen L. et al. Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils. *J. Immunol.*, 1995, v. 154, p. 4157–4165.
62. Serbina N.V., Jia T., Hohl T.M. and Pamer E.G. Monocyt-mediated defense against microbial pathogens. *Ann. Rev. Immunol.*, 2008, v. 26, p. 421–452.
63. Sumbly P., Barbian K.D., Gardner D.J. et al. Extracellular deoxyribonuclease made by group A *Streptococcus* assists pathogenesis by enhancing evasion of the innate immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, v. 102, p. 1679–1684.
64. Trowbridge H.O. and Emling R. *Inflammation: a review of the process*. 5ed., Chicago, Quintessence Publishing Co, Inc., 1997.
65. Urban C.F., Reichard U., Brinkmann V. and Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol.*, 2006, v. 8, p. 668–676.
66. Vitkov L., Klappacher M., Hannig M. and Krautgartner W.D. Extracellular neutrophil traps in periodontitis. *J. Periodont. Res.*, 2009, v. 44, p. 664–672.
67. Wang Y., Li M., Stadler S. et al. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J. Cell Biol.*, 2009, v. 184, p. 205–213.
68. Wassenaar T.M., Engelskirchen M., Park S. and Lastovica A. Differential uptake and killing potential of *Campylobacter jejuni* by human peripheral monocytes/macrophages. *Med. Microbiol. Immunol.*, 1997, v. 186, p. 139–144.
69. Weinrauch Y., Drujan D., Shapiro S.D. et al. Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. *Nature*, 2002, v. 417, p. 91–94.
70. 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, v. 113, p. 6419–6427.

Поступила в редакцию 16.09.10
Получена после доработки 30.11.10

DISCOVERY OF THE NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS BEGINS A NEW STAGE IN THE STUDY OF NEUTROPHIL MORPHOGENESIS AND FUNCTION

M.D. Perova and M.G. Shubich

The purpose of the present review was to analyze the accumulating evidence regarding recently discovered novel defense mechanism of neutrophils — capacity to form neutrophil extracellular traps (NETs). Contact with pathogenic microbes and/or exposure to proinflammatory cytokines trigger the respiratory burst in the neutrophils with a subsequent initiation of a cell death (NETosis) which differs from apoptosis and necrosis. NETs are formed by the fibrils of decondensed chromatin (DNA/histones), released from the neutrophil, which is closely associated with the antimicrobial proteins of cytoplasmic granules. Due to its three-dimensional structure, NETs are capable of retaining the microorganisms (bacteria, fungi and protozoa), while high local concentration of the antimicrobial substances provides their killing. The review presents the evidence of a potential defensive role of NETs in infectious diseases, traumas and surgical operations, as well as during the early stage of a repair process. Considering the role played by neutrophils in the immune response orientation via pentraxin-3 (PTX3), including the switching to adaptive immunity, it is necessary to study the subsequent interaction of DNA/histone extracellular structures with the tissue microenvironment.

Key words: *neutrophil granulocytes, extracellular neutrophil traps (NETs)*

Kuban State Medical University, South-Russian Center of Plastic Surgery, Krasnodar Krasnodar Center of Periodontology and Dental Implantation