

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЗАЩИТНЫХ МЕХАНИЗМОВ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЯХ И ИХ ВКЛАД В ПАТОГЕНЕЗ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ

© 2018 г. Е. В. Матосова*, Б. Г. Андрюков

*E-mail: e_matosova@mail.ru

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова»,
Владивосток, Россия

Поступила: 13.10.2017. Принята: 25.12.2017

Инфекции – одна из основных причин смертности и заболеваемости в мире. Нейтрофилы являются активным и многочисленным эффекторным звеном врожденной иммунной системы, который защищает организм от инфицирования патогенными микроорганизмами. Однако вклад нейтрофилов в развитие инфекционного процесса был недооценен, несмотря на то, что функции этого подкласса лейкоцитов давно известны в качестве патогенетического элемента воспаления. В дополнение к фагоцитозу эти клетки могут опосредовать менее охарактеризованные антибактериальные стратегии – внеклеточную дегрануляцию, а также, высвобождая внеклеточный хроматин, ядерный белок и сериновые протеазы, образовывать сетчатые волоконные структуры, называемые нейтрофильными внеклеточными ловушками (NETs). NETs могут захватывать патогены, вызывать эндотелиальную дисфункцию и провоспалительные иммунные реакции. Феномен NETs – это сравнительно новая форма программируемой клеточной смерти (нетоз), значение которой в развитии инфекционного процесса и развитии воспаления до конца не изучено. Нетоз имеет высокий потенциал для дальнейшего изучения патогенеза воспаления и поиска эффективных методов лечения инфекций. В этом обзоре основное внимание уделяется современным данным об основных защитных стратегиях нейтрофилов при бактериальных инфекциях и их вкладу в патогенез провоспалительных реакций. Обсуждаются современные подходы к фармакологической модуляции различных вариантов антимикробных механизмов нейтрофилов, что перспективно в случаях комплексного лечения инфекций, ассоциированных с антибиотикорезистентными штаммами бактерий.

Ключевые слова: инфекционные болезни, нейтрофилы, воспаление, антибиотикорезистентность, фагоцитоз, дегрануляция, нейтрофильные внеклеточные ловушки (NETs), обзор

DOI: 10.7868/S1028722118010021

ВВЕДЕНИЕ

Иммунная система человека защищает организм от патогенных бактерий, которые потенциально способны вызвать инфекционные болезни. Сегментоядерные нейтрофилы, являясь доминирующим подклассом лейкоцитов в периферической крови, имеют большое значение в функционировании врожденной иммунной системы человека. Этот пул клеток образуется и созревает в костном мозге. Примерно 100 миллиардов нейтрофилов ежедневно высвобождаются в периферическую кровь и выходят из нее в ткани, опосредуя иммунные реакции, которые играют решающую роль против

Адрес: 690087, Владивосток, Сельская, 1, НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова. Матосова Екатерина Владимировна. Тел.: 8 (423) 244-26-04.

E-mail: e_matosova@mail.ru

Авторы

Матосова Е.В., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и микробиологии НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, Владивосток, Россия;

Андрюков Б.Г., д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и микробиологии НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, Владивосток, Россия.

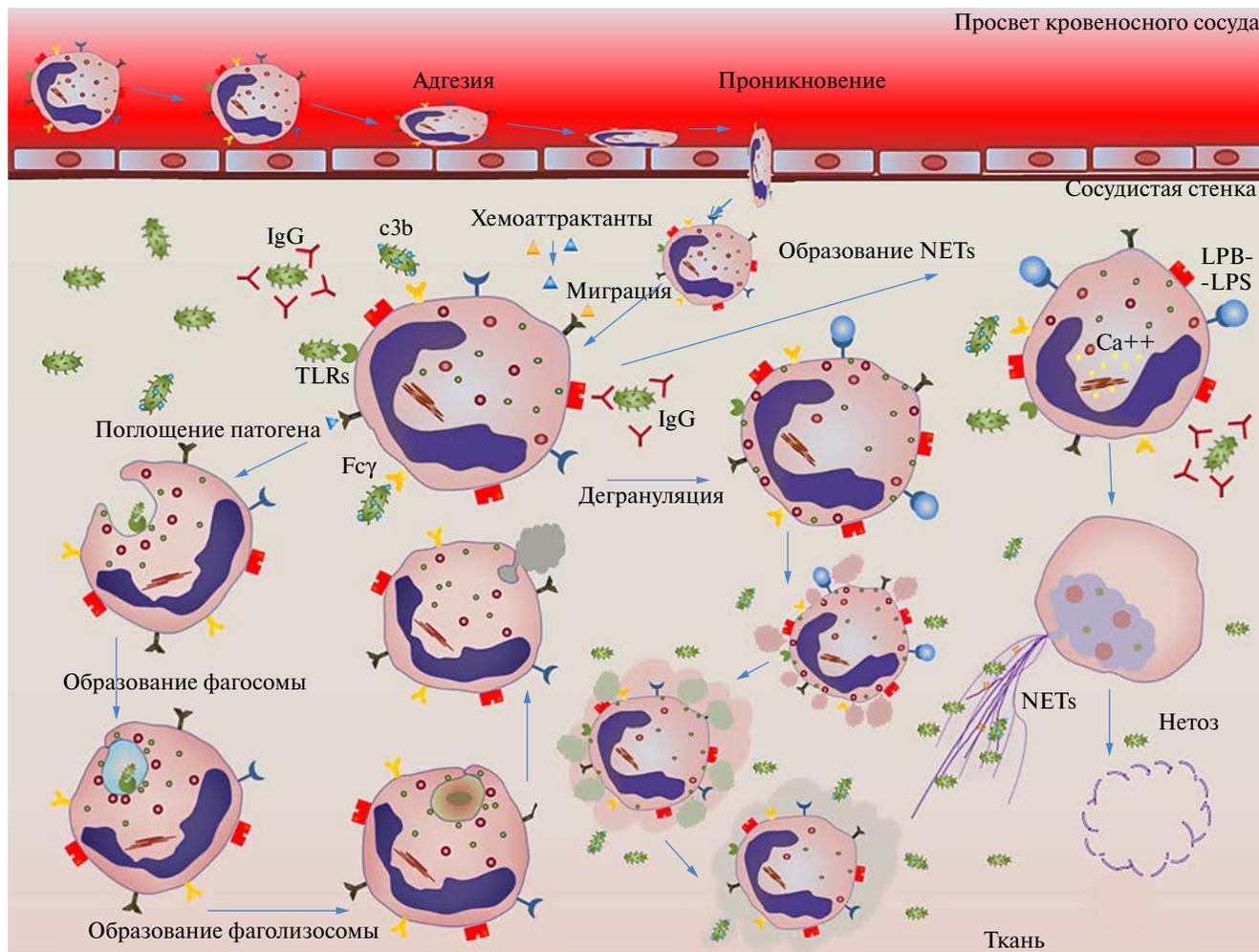


Рис. 1. Антибактериальные стратегии нейтрофилов (рис. авторов)

микробных инфекций [1, 2]. Наследственные или приобретенные нейтропении, а также нарушения функции нейтрофилов приводят к возникновению рецидивов бактериальных инфекций, угрожающих жизни [3].

Нейтрофилы являются первыми иммунокомпетентными клетками, которые встречают патогены после прохождения ими эпителиальных барьеров. Репликация бактерий в тканях организма приводит к высвобождению ими экзогенных продуктов и сигнальных молекул, которые обнаруживаются нейтрофилами посредством Toll-подобных (TLR), G-белковых и иммунных рецепторов [2, 4]. После получения рецепторного сигнала нейтрофилы реагируют на эти раздражители, мигрируют из кровеносных сосудов к месту заражения и фагоцитируют бактерии.

Этот многоступенчатый и сложный процесс включает последовательные этапы: адгезию нейтрофилов к эндотелиальным клеткам,

трансэндотелиальную экстравазацию, хемотаксическую миграцию, опсонизацию и последующее уничтожение инокулированных бактерий. После миграции к очагу заражения и фагоцитоза нейтрофилы используют имеющиеся у них антимикробные стратегии для выполнения этой функции [1, 4]. При этом используется комбинация из компонентов цитотоксических гранул, биологически активных пептидов, активных форм кислорода (ROS) и формирования внеклеточных ловушек нейтрофилов (NETs) для создания необходимых условий для эффективного уничтожения и деградации бактерий [5, 6].

С другой стороны, в процессе эволюции многие бактерии выработали эффективные механизмы защиты от антимикробных стратегий нейтрофилов, основные из которых можно разделить на пять категорий: уклонение от хемотаксиса, предотвращение опсонизации и фагоцитоза, выживание внутри нейтрофилов,

индуцирование гибели клеток и формирование биопленок [7, 8].

Цель обзора: анализ современных данных об основных защитных стратегиях нейтрофилов при бактериальных инфекциях и их вкладе в патогенез провоспалительных реакций.

Нейтрофил-опосредованный фагоцитоз патогенных бактерий

Фагоцитарная теория “целебной силы организма” была впервые предложена в 1883 г. И.И. Мечниковым, за что он в 1908 г. вместе с П. Эрлихом был удостоен Нобелевской премии. На протяжении многих лет нейтрофильный фагоцитоз считался единственным средством борьбы организма с чужеродными объектами, включая инфекции. В дальнейшем было показано, что помимо нейтрофилов способностью к фагоцитозу обладают моноциты (тканевые макрофаги) [9, 10].

Первой реакцией на микробную инвазию организма является покидание нейтрофилами сосудистого русла и их миграция к очагу инфицирования (рис. 1). Этот процесс состоит из трех основных этапов: инициирование адгезии нейтрофилов к активированным эндотелиальным клеткам, проникновение через сосудистую стенку и их миграция к месту заражения.

Процесс фагоцитоза протекает в несколько этапов: хемотаксис (направленная миграция нейтрофилов к бактериям), распознавание рецепторов, активация клеток, поглощение и переваривание бактерий [8, 11, 12].

Хемотаксис зависит от градиентов концентрации хемоаттрактантов (эндогенных и экзогенных), которые определяют направленное движение фагоцитов [10, 11, 13]. В качестве хемоаттрактантов могут выступать молекулы, высвобождаемые при гибели клеток, биоактивные пептиды (лейкотриены, LTB₄), хемокины (IL-8, CXCL2, CXCL1) или провоспалительные цитокины (IL-1 β , TNF- α), продуцируемые стромальными, эпителиальными и иммунными клетками [12, 13].

Узнавание бактерий нейтрофилами основано на обнаружении поверхностных и внутриклеточных рецепторов. Нейтрофилы распознают чужеродные объекты с помощью рецепторов PRR (pattern recognition receptors) [14, 15]. В человеческом организме наиболее значимыми нейтрофильными структурами подобного типа являются Toll-подобные рецепторы (toll-like receptors, TLRs): TLR1, TLR2, TLR3, ... TLR10. Эти рецепторы имеют много общего

в структуре и механизме действия. Для последующего распознавания TLRs связываются с соответствующими высококонсервативными бактериальными лигандами, каждый из которых является специфическим для больших групп патогенов. Например, липопептиды являются лигандами для TLR1, а пептидогликаны грамположительных и грамотрицательных бактерий являются мишенями для TLR2, эндотоксин грамотрицательных бактерий – для TLR4 [16, 17]. Связывание TLRs со специфическими лигандами приводит к активации нейтрофилов, замедляет их апоптоз и индуцирует секрецию цитокинов.

Опсонизация (буквальный перевод с греческого – “подготовка к обеду”) патогенов является мощным усилителем активности фагоцитоза. Она происходит с участием классических опсоинов IgG и C3b и нейтрофильных рецепторов к ним, посредством которых фагоциты способны различать бактерий: Fc γ (Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII), и лектинов С-типа (маннозные рецепторы, лектины, мутантные рецепторы). Иммуноглобулин и комплемент, в состав молекул которого входят Fc-фрагменты, фиксируют бактерии, а нейтрофилы, имеющие на своей поверхности группы рецепторов Fc γ , распознают, захватывают и поглощают патогены. Понятно, что фагоцитоз неэффективен в отсутствие опсонизации патогена [15, 17, 18]. Однако при взаимодействии нейтрофилов с биопленками микробов опсонизация патогена не требуется, так как в матриксе содержатся вещества, которые активируют нейтрофилы [19, 20].

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 и лизосомы с образованием фаголизосом.

Внутриклеточное “переваривание” инфекционных агентов реализуется в результате активации двух сложных механизмов внутриклеточного уничтожения. Микроорганизмы внутри фаголизосомы уничтожаются под действием бактерицидных компонентов нейтрофильных гранул, таких как дефенсины, кателицины, катепсины, пентаксины и лактоферрин и ряд других протеинов. В последние десятилетия с использованием протеомного анализа исследователям удалось идентифицировать

Таблица. Пептидный состав нейтрофильных гранул и механизмы антибактериальной защиты

Пептиды	Основной механизм	Альтернативный механизм	Локализация
α -дефенсины	Ингибируют НК, белки, синтез клеточных мембран	Опсонизация бактерий, выработка ROS	Первичные гранулы, NETs
LL-37	Формируют трансмембранные поры	Участвуют в выработке ROS	Вторичные гранулы, NETs
Бактерицидный белок, повышающий проницаемость	Нейтрализация эндотоксинов Гр(-) флоры	Ингибируют цитокины, активация апоптоза бактерий	Первичные гранулы
Гистоны	Активация мембран	Формирование NETs	Ядро, NETs
Лизозимы	Дегградация бактериальных мембран	Формирование NETs	Лизосомы
Протеиназа-3	Активация протеолиза, дегградация факторов вирулентности	Формирование NETs	Первичные гранулы, NETs
Нейтрофильная эластаза	Активация протеолиза, дегградация факторов вирулентности	Формирование NETs	Первичные гранулы, NETs
Катепсин G	Активация протеолиза	Формирование NETs	Первичные гранулы, NETs
Сериновая протеаза 4	Трипсин-подобное	Неизвестный	Первичные гранулы
Азуроцидин	Активация мембран	Опсонизация бактерий	Первичные гранулы
Лактоферрин	Связывает железо и ЛПС бактериальных стенок	Входящая в состав белка окисленная форма железа инициирует ПОЛ*	Первичные гранулы
Кальпротектин (S100A, calgranulin)	Связывает марганец и цинк, лишая бактерий нужных микроэлементов	Формирование NETs, является маркером воспаления в ЖКТ	Вторичные гранулы, 60% цитозольных белков
NADPH oxidase	Генерирует ROS в фагосомах	Формирование NETs, инициация ПОЛ	Вторичные гранулы, плазматическая мембрана
Миелопероксидаза	Образует хлорноватистую кислоту, обладающую мощной антимикробной активностью	Формирование NETs	Первичные гранулы, лизосомы

Примечание: *перекисное окисление липидов.

и охарактеризовать около 30 гранулярных белков, обладающих антимикробной активностью. Некоторые из них представлены в табл. [21, 22].

Гранулы делятся на четыре типа: первичные (азурофильные), возникающие в процессе дифференцировки на стадии промиелоцита; вторичные (специфические), возникающие при трансформации нейтрофилов в миелоциты; желатиназные или третичные гранулы [19, 23]; секреторные (везикулы), появляющиеся в зрелых сегментированных формах [9, 19]. Все типы гранул различаются по пептидному составу и обеспечивают различные механизмы антимикробной функции нейтрофилов. Первичные (азурофильные) гранулы содержат миелопероксидазу (MPO) и спектр нейтрофильных сериновых протеаз (NSP), таких как катепсин

G (CG), нейтрофильная эластаза (NE), протеиназа-3 (PR3) и недавно обнаруженная нейтрофильная серин протеаза-4 (NSP4) [22, 23].

Вторичные или специфические гранулы содержат в основном антибактериальные компоненты, такие как лактоферрин (специфический маркер), лизоцим, ряд белков и ферментов [19, 22, 24]. Основным ферментом третичных гранул является желатиназа (специфический маркер). Она служит резервом матрикс-деградирующих ферментов и мембранных рецепторов, необходимых для экстравазации и диапедеза нейтрофилов. Секреторные гранулы (везикулы) или эндосомы содержат металлопротеиназы и щелочную фосфатазу (специфический маркер), а также ряд белков. Они являются наиболее подвижными гранулами зрелого

нейтрофила. После слияния эндосом с нейтрофильной мембраной образуются рецепторы плазматической мембраны нейтрофила [21, 22, 24].

Nordenfelt R. et al. (2011) показали, что процесс поглощения опсонизированных частиц при нейтрофильном фагоцитозе происходит менее чем за 20 секунд [25]. Но при этом клетки микроорганизмов в биопленках менее доступны для фагоцитоза, чем отдельные клетки, получившие название “планктонных”. Когда нейтрофилы взаимодействуют *in vitro* с биопленками *S. aureus*, 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 [26].

Таким образом, в антимикробной защите нейтрофилы имеют до 300 различных ферментных и белковых компонентов гранул, которые могут секретироваться во внеклеточном пространстве или оставаться связанными с мембраной нейтрофилов. Эти компоненты одинаково токсичны как для микроорганизмов, так и для клеток хозяина, обладают высокой реакционной способностью, широкой субстратной специфичностью и антимикробной активностью.

Дегрануляция нейтрофилов

Важнейшим критерием функциональной активации клеток врожденного иммунитета при инфекционном воспалении, является дегрануляция (экзоцитоз) нейтрофилов с регулируемым и последовательным высвобождением арсенала содержимого гранул в цитоплазму и во внеклеточное пространство. Этот процесс регулируется структурными изменениями актинового цитоскелета клетки и сигналами рецепторного аппарата на внешнюю стимуляцию [9, 11, 27].

С этой антимикробной стратегией нейтрофилов, которая является прогностическим показателем риска генерализации воспалительного процесса [9, 13, 28], связывается триггерная роль в связи с появлением дегенеративных сосудистых и тканевых изменений, ассоциированных с инфекционным процессом [9].

Основным механизмом секреторной дегрануляции нейтрофилов является последовательное и строго регулируемое высвобождение содержимого гранул в клеточную цитоплазму и во внеклеточное пространство. При этом высвобождается широкий спектр протеолитических ферментов и антибактериальных пептидов, обладающих цитотоксическим действием. Регуляция процесса осуществляется структурными изменениями актинового цитоскелета после сигнальной стимуляции рецепторным аппаратом клетки [19, 29].

При рассмотрении механизмов фагоцитоза было отмечено активное участие содержимого гранул, секреция которого активно происходит в процессе фагосомно-лизосомального слияния. Выделение дегрануляции в качестве отдельной антибактериальной стратегии произошло вследствие появления многочисленных данных об автономности экзоцитоза.

Обнаружение и количественное определение в плазме крови гранулярных энзимов и антимикробных пептидов используется в клинических и научных исследованиях при различных физиологических и патологических процессах. Они рассматриваются в качестве основных гуморальных факторов врожденного иммунитета (лизоцим), и являются маркерами синдрома эндогенной интоксикации (среднемолекулярные пептиды), активности воспалительного процесса (лактоферрин), скрининга специфических антител при аутоиммунных заболеваниях для выявления соответствующих антигенов гранулоцитов и оценки состояния гомеостаза [9, 11, 19]. Клиническое значение определения этих ферментов и пептидов связывается с их участием в координации иммунного ответа и внеклеточном управлении инфекционным воспалением [19].

Кроме того, в качестве маркера активности дегрануляции нейтрофилов используют ряд количественных показателей: повышение экстрацеллюлярной активности эластазы [22, 27], снижение внутриклеточного содержимого первичных гранул, содержащих эластазу и сериновые протеазы [21, 25], увеличение содержания в плазме крови комплекса эластаза- α -1-ингибитор [24, 28].

С появлением феномена дегрануляции нейтрофилов связывают формирование более напряженного иммунитета [19, 30], а количественные маркеры интенсивности дегрануляции могут рассматриваться в качестве показателей иммуногенной активности бактериальных вакцин [9, 19]. Дегрануляция нейтрофилов

запускается при их активации молекулярными паттернами грамотрицательных бактерий (липополисахаридами, ЛПС) [19, 27, 29, 30] и сопровождается секрецией провоспалительных цитокинов [9, 19, 30], при киллинге опсонизированных микроорганизмов [19, 22] или взаимодействии с белками внеклеточного матрикса, такими как фибронектин, коллаген и ламинин [27, 30].

В недавнем исследовании Naegelen I. et al. (2015) изучали динамику секреции активированными нейтрофилами цитокинов и эффекта дегрануляции гранулоцитов [29]. Было выявлено, что секреция цитотоксических белков, содержащихся в гранулах, и цитокинов активированными нейтрофилами, обнаруженными в очагах инфекции, имеет выраженные кумулятивный и синергический эффекты, влияющие на формирование тканевого воспаления в окружающих тканях. Это подтверждает результаты, полученные Malcolm K. et al. (2003) [31].

Исследования, выполненные в последние годы, показали, что первичная реакция в очаге воспаления является первым шагом афферентного участия нейтрофилов в модуляции иммунных реакций – врожденной иммунной системы и приобретенного адаптивного иммунитета. Характер инфекционного процесса зависит от течения иммунных реакций и эффективности антибактериальных систем клеток врожденного иммунитета, в том числе нейтрофилов, функционирующих не только в качестве фагоцитов. Они, непосредственно взаимодействуя с лимфоцитами [9, 12], естественными клетками-киллерами [10, 19], макрофагами [12, 19] и дендритными клетками [19, 24], играют центральную роль в реализации реакций адаптивного иммунитета. Это взаимодействие опосредуется способностью нейтрофилов секретировать ряд цитокинов, которые непосредственно взаимодействуют с другими иммунокомпетентными клетками [9, 12, 19].

Формирование нейтрофильных внеклеточных ловушек, убивающих бактерии

Кроме фагоцитоза и внеклеточной дегрануляции нейтрофилы проявляют антибактериальную активность посредством образования внеклеточных сетей-ловушек (neutrophilic extracellular traps, NETs), которые были впервые описаны Brinkmann et al. в 2004 г. [32, 33].

При формировании NETs происходит высвобождение на скопление бактерий сетчатых

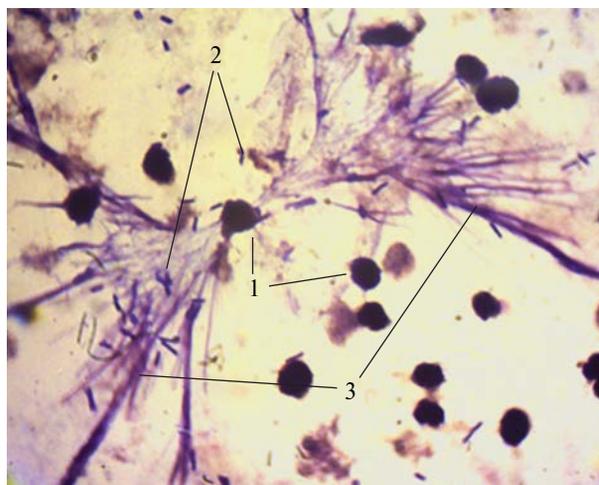


Рис. 2. Нейтрофильная внеклеточная ловушка. Световая микроскопия, x 1500. Окрашивание по Романовскому-Гимзе (фото авторов, клинический материал).

Примечание.

1 – нейтрофильный гранулоцит;

2 – бактериальные клетки;

3 – волокна деконденсированного хроматина с прикрепленными белками.

структур, состоящих из нитей нуклеиновых кислот связанных с гистонами, а также гранулярными антимикробными пептидами и ферментами (рис. 2). Этот процесс позднее получил название “нетоз” (NETosis) и стал рассматриваться в качестве новой формы программируемой гибели клеток (ПГК) [33].

В молекулярном механизме формирования NETs важную роль играют два компонента. Один из них – производство ROS, которое зависит от активности ключевых ферментов – МРО и NADPH-оксидазы. Второй компонент связан с деконденсацией хроматина. В недавних исследованиях было показано, что ключевым ферментом этого процесса является нейтрофильная эластаза [34–37].

Вместе с тем, при недостаточном контроле цитотоксичность NETs оказывает неблагоприятное действие для организма-хозяина. При ряде воспалительных заболеваний бактериальной этиологии (васкулит, сепсис, системная красная волчанка, нефрит) может происходить чрезмерное образование ловушек, что может привести к эпителиальной дисфункции и тромбозам [38, 39]. Исследования, проведенные Amulic B. (2011), показали, что активация эндотелиальных клеток и чрезмерное образование NETs лежат в основе патогенеза преэмплампсии у беременных [40].



Рис. 3. Бактериальное ингибирование механизмов ключевых этапов фагоцитоза (рис. авторов)

Механизмы резистентности бактерий к защитным стратегиям нейтрофилов

В процессе эволюции бактерии выработали набор оборонительных контрмер против антимикробных стратегий нейтрофилов. Они направлены на ингибирование механизмов ключевых этапов фагоцитоза (рис. 3).

Противодействие антибактериальным стратегиям нейтрофилов на первом этапе фагоцитоза (покидание сосудистого русла и миграция к очагу инфицирования) направлено на ингибирование его основных звеньев. Например, суперантиген-подобные белки *S. aureus* SSL5, SSL7 и SSL8 блокируют адгезию нейтрофилов к эндотелиальным клеткам путем связывания с рецептором лиганд-1 гликопротеина Р-селектина (PSGL-1) [41]. Аналогичный механизм был впоследствии обнаружен и у других бактерий и вирусов [42]. Кроме того, было выявлено, что белки SSL5, SSL7 и SSL8 также ингибируют реакции нейтрофилов на некоторые хемокины и компоненты комплемента C3a и C5a.

В конце XX века во многих патогенных штаммах *S. aureus* был обнаружен белок внеклеточного прилипания (Eap), впоследствии описанный как один из факторов вирулентности стафилококков [43, 44], обеспечивающих бактериальную адгезию и агрегацию. Помимо этого, была выявлена способность Eap ингибировать миграцию нейтрофилов к очагу воспаления

путем связывания и ингибирования рецептора ICAM-1, который экспрессируется на поверхности эндотелиальных клеток [45, 46]. Кроме того, бактерии могут выделять различные протеазы, что приводит к деградации хемокинов. Например, хемотаксис-ингибирующий белок (CHIPS), белок, свободно секретируемый *S. aureus*, непосредственно связывает и блокирует рецепторы C5a (C5aR) и формил-пептидов (FPR) и тем самым ингибирует миграцию нейтрофилов [47].

Ряд бактериальных патогенов (*S. aureus*, *C. perfringens*, *Acinetobacter* и *S. pyogenes*) разработали сложные механизмы для подавления процесса формирования нейтрофилами NETs и различные способы противодействия внеклеточным ловушкам. Одними из наиболее распространенных механизмов являются экспрессия нуклеаз, которые способны вызывать деградацию NETs [48], а также ингибировать образование NETs путем деградации нейтрофил-стимулирующего хемокина IL-8 с участием пептидазы SpuCEP [49, 50].

ВЫВОДЫ

Несмотря на признание центральной роли фагоцитоза и врожденной иммунной системы в патогенезе бактериальных инфекций, разработка тактики их лечения остается

ориентированной на антибиотикотерапию. Взаимодействие между нейтрофилами и патогенными бактериями на сей день остается интересным и до конца не изученным разделом иммунологической защиты организма. Нейтрофилы занимают первую линию обороны от инфекционных агентов, располагая для защиты арсеналом антимикробных стратегий. В свою очередь, патогенные бактерии выработали ряд механизмов, позволяющих им уклоняться от нейтрофильных атак для последующей репликации и колонизации организма-хозяина.

Изучение антимикробных стратегий нейтрофилов имеет высокий потенциал для поиска новых фармакологических средств для модуляции их функциональной активности, направленной против патогенов человека. Среди препаратов направленного терапевтического действия, уже прошедших клинические испытания при лечении различных, в том числе инфекционных заболеваний, следует отметить индуцируемый гипоксией фактор 1 (HIF-1) [51, 52], врожденные защитные регуляторы пептидов (IDR-НН2, IDR-1002 и IDR-1018) [16, 53] и витамин В₃, которые усиливают антимикробную активность нейтрофилов за счет улучшения их адгезии к эндотелиальным клеткам, стимулирования миграции фагоцитов и образования хемокинов. Кроме того, выявлено, что IDR значительно подавляют LPS-опосредованную дегрануляцию нейтрофилов, высвобождение ROS и секрецию провоспалительных цитокинов TNF и IL-10, что позволяет снизить воспаление. Фармакологические препараты тамоксифен [54] или анакардиновая кислота [55] индуцируют формирование NETs и нейтрофильный фагоцитоз.

Современная озабоченность общества по поводу стремительного роста антибиотикорезистентности патогенных бактерий заставляет иначе взглянуть на роль и влияние функциональной активности нейтрофилов и их антибактериальных стратегий на эффективность антибиотикотерапии. Рекомендации по традиционному применению антибиотиков в отношении доз, способов и кратности введения основаны на фармакокинетике и фармакодинамике этой группы препаратов на экспериментальных моделях и добровольцах (по большей части здоровых) без учета взаимодействия и соучастия антибактериальных стратегий нейтрофилов.

Возможно, применение указанных средств, модулирующих различные звенья антимикробных стратегий нейтрофилов, перспективно в

случаях комплексного лечения инфекций, ассоциированных с антибиотикорезистентными штаммами бактерий. Это может в конечном итоге обеспечить критически новый уровень иммунологической защиты организма и повысить эффективность лечения.

БЛАГОДАРНОСТЬ

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

Авторы выражают признательность младшему научному сотруднику лаборатории молекулярной эпидемиологии и микробиологии НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова Быниной Марине Павловне за помощь в подготовке материалов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. *Borregaard N.* Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*. 2010; 33(5): 657–70. doi: 10.1016/j.immuni.2010.11.011.
2. *Leliefeld P.H., Wessels C.M., Leenen L.P., Koenderman L., Pillay J.* The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation. *Crit Care*. 2016; 20: 73. doi: 10.1186/s13054-016-1250-4.
3. *Nathan C.* Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* 2006; 6(3): 173–82. doi: 10.1038/nri1785.
4. *Mayadas T.N., Cullere X., Lowell C.A.* The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev. Pathol.* 2014; 9: 181–218. doi: 10.1146/annurev-pathol-020712-164023.
5. *Segal A.W.* How neutrophils kill microbes. *Annu Rev. Immunol.* 2005; 23: 197–223. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115653. [доступ 11 сентября 2017] Адрес: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2092448/>
6. *Urban C.F., Lourido S., Zychlinsky A.* How do microbes evade neutrophil killing? *Cell. Microbiol.* 2006; 8(11): 1687–96. doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00792.x.
7. *Döhrmann S., Cole J.N., Nizet V.* Conquering neutrophils. *PLoS Pathog.* 2016; 12(7): e1005682. doi: 10.1371/journal.ppat.1005682. [доступ 11 сентября 2017] Адрес: <http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1005682>
8. *Nauseef W.M.* Neutrophils, from cradle to grave and beyond. *Immunol. Rev.* 2016; 273(1): 5–10. doi: 10.1111/imr.12463.
9. *Dunkelberger J.R., Song W.C.* Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res.* 2010; 20(1): 34–50. doi: 10.1038/cr.2009.139.

- [доступ 11 сентября 2017] Адрес: <https://www.nature.com/cr/journal/v20/n1/full/cr2009139a.html>
10. van Kessel K.P., Bestebroer J., van Strijp J.A. Neutrophil-mediated phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. *Front Immunol.* 2014; 5: 467. doi: 10.3389/fimmu.2014.00467. [доступ 11 сентября 2017] Адрес: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00467/full>
 11. Rigby K.M., DeLeo F.R. Neutrophils in innate host defense against *Staphylococcus aureus* infections. *Semin. Immunopathol.* 2012; 34(2): 237–59. doi: 10.1007/s00281-011-0295-3. [доступ 11 сентября 2017] Адрес: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00281-011-0295-3>
 12. Ford J.W., McVicar D.W. TREM and TREM-like receptors in inflammation and disease. *Curr. Opin. Immunol.* 2009; 21(1): 38–46. doi: 10.1016/j.coi.2009.01.009.
 13. Mócsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J. Exp. Med.* 2013; 210(7): 1283–99. doi: 10.1084/jem.20122220. [доступ 11 сентября 2017] Адрес: <http://jem.rupress.org/content/210/7/1283.long>
 14. Amulic B., Cazalet C., Hayes G.L., Metzler K.D., Zychlinsky A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu. Rev. Immunol.* 2012; 30: 459–89. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-074942.
 15. Roos D., van Bruggen R., Meischl C. Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes Infect.* 2003; 5(14): 1307–15. doi: 10.1016/j.micinf.2003.09.009.
 16. Greenlee-Wacker M., DeLeo F.R., Nauseef W.M. How methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* evade neutrophil killing. *Curr Opin Hematol.* 2015; 22(1): 30–5. doi: 10.1097/MOH.000000000000096.
 17. Odobasic D., Kitching A.R., Holdsworth S.R. Neutrophil-mediated regulation of innate and adaptive immunity: the role of myeloperoxidase. *J. Immunol. Res.* 2016; 2016: 11. doi: 10.1155/2016/2349817.2349817. [доступ 17 сентября 2017] Адрес: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2349817>.
 18. Bardoel B.W., Kenny E.F., Sollberger G., Zychlinsky A. The Balancing Act of Neutrophils Cell Host and Microbe. *Cell Host Microbe.* 2014; 15(5): 526–36. doi: 10.1016/j.chom.2014.04.011. [доступ 11 сентября 2017] Адрес: <http://www.cell.com/action/showImagesData?pii=S1931-3128%2814%2900145-0>
 19. Klebanoff S.J. Myeloperoxidase: friend and foe. *J. Leukoc Biol.* 2005; 77(5): 598–625. doi: 10.1189/jlb.1204697. 28.
 20. Dapunt U., Hansch G.M., Arciola C.R. Innate Immune Response in Implant-Associated Infections: Neutrophils against Biofilms. *Materials.* 2016; 9(5): 387. [доступ 11 сентября 2017] Адрес: <http://www.mdpi.com/1996-1944/9/5/387/html>
 21. Morozov V.I., Pryatkin S.A., Kalinski M.I., Rogozkin V.A. Effect of exercise to exhaustion on myeloperoxidase and lysozyme release from blood neutrophils. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2003; 89(3–4): 257–62. doi: 10.1007/s00421-002-0755-5.
 22. Winterbourn C.C., Kettle A.J., Hampton M.B. Reactive oxygen species and neutrophil function. *Annu Rev. Biochem.* 2016; 85: 765–92. doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014442.
 23. Cardot-Martin E., Casalegno J.S., Badiou C., Dauwalder O., Keller D., Prévost G., Rieg S.; Kern W.V.; Cuerq C.; Etienne J.; Vandenesch F.; Lina G.; Dumitrescu O. α -Defensins partially protect human neutrophils against Panton-Valentine leukocidin produced by *Staphylococcus aureus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 2015; 61(2): 158–64. doi: 10.1111/lam.12438.
 24. Frasca L., Lande R. Role of defensins and cathelicidin LL37 in auto-immune and auto-inflammatory diseases. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2012; 13(10): 1882–97. doi: 10.2174/138920112802273155.
 25. Nordenfelt P., Tapper H.J. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 2011; 90(2): 271–84. doi: 10.1189/jlb.0810457.
 26. Chebotar' I.V. Mechanisms of antibiofilm immunity. *Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk.* 2012; (12): 22–9.
 27. Schuerholz T., Brandenburg K., Marx G. Antimicrobial peptides and their potential application in inflammation and sepsis. *CritCare.* 2012; 16(2): 207. doi: 10.1186/cc11220. [доступ 17 сентября 2017] Адрес: <https://doi.org/10.1186/cc11220>
 28. Cojocar I.M., Cojocar 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. [доступ 17 сентября 2017] Адрес: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18386609>
 29. Naegelen I., Beaume N., Plançon S., Schenten V., Tschirhart E.J., Bréhard S. Regulation of Neutrophil Degranulation and Cytokine Secretion: A Novel Model Approach Based on Linear Fitting. *J. Immunol. Res.* 2015; 2015: 817038. doi: 10.1155/2015/817038 [доступ 17 сентября 2017] Адрес: <https://www.hindawi.com/journals/jir/2015/817038/>
 30. Park C.B., Yi K.S., Matsuzaki K., Kim M.S., Kim S.C. Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; 97(15): 8245–50. doi: 10.1073/pnas.150518097. [доступ 17 сентября 2017] Адрес: <http://www.pnas.org/content/97/15/8245.long>
 31. Malcolm K.C., Worthen G.S. Lipopolysaccharide stimulates p38-dependent induction of antiviral genes in neutrophils independently of paracrine factors. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(18): 15693–701. doi: 10.1074/jbc.M212033200 [доступ 17 сентября 2017] Адрес: <http://www.jbc.org/content/278/18/15693.long>
 32. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004; 303(5663): 1532–5.
 33. Brinkmann V., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J. Cell. Biol.* 2012; 198: 773–83. doi: 10.1083/

- jcb.201203170. [доступ 17 сентября 2017] Адрес: <http://jcb.rupress.org/content/198/5/773.long>
34. Klebanoff S.J., Kettle A.J., Rosen H., Winterbourn C.C., Nauseef W.M. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. *J. Leukoc. Biol.* 2013; 93(2): 185–98. doi: 10.1189/jlb.0712349.
 35. Theeß W., Sellau J., Steeg C., Klinke A., Baldus S., Cramer J.P., Jacobs T. Myeloperoxidase attenuates pathogen clearance during *Plasmodium yoelii* nonlethal infection. *Infect Immun.* 2016; 85(1): e00475–16. doi: 10.1128/IAI.00475–16. [доступ 17 сентября 2017] Адрес: <http://iai.asm.org/content/85/1/e00475–16.long>
 36. Delgado-Rizo V., Martínez-Guzmán M.A., Iñiguez-Gutierrez L., García-Orozco A., Alvarado-Navarro A., Fafutis-Morris M. Neutrophil Extracellular Traps and Its Implications in Inflammation: An Overview. *Front Immunol.* 2017; 8: 81. doi: 10.3389/fimmu.2017.00081. [доступ 17 сентября 2017] Адрес: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.00081/full>
 37. Yang H., Biermann M.H., Brauner J.M., Liu Y., Zhao Y., Herrmann M. New Insights into Neutrophil Extracellular Traps: Mechanisms of Formation and Role in Inflammation. *Front Immunol.* 2016 Aug 12; 7: 302. doi: 10.3389/fimmu.2016.00302. [доступ 17 сентября 2017] Адрес: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2016.00302/full>
 38. Chakraborty S., Kaur S., Guha S., Batra S.K. The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012; 1826(1): 129–69. doi: 10.1016/j.bbcan.2012.03.008.
 39. Koymans K.J., Feitsma L.J., Brondijk T.H., Aerts P.C., Lukkien E., Lössl P., Kok P.M.; de Haas, Carla J. C.; van Strijp, J.A G; Huizinga E.G. Structural basis for inhibition of TLR2 by staphylococcal superantigen-like protein 3 (SSL3). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015; 112(35): 11018–23. doi: 10.1073/pnas.1502026112. [доступ 17 сентября 2017] Адрес: <http://www.pnas.org/content/112/35/11018.long>
 40. Amulic B., Hayes G. Neutrophil extracellular traps. *Curr. Biol.* 2011; 21(9): R297–8. doi: 10.1016/j.cub.2011.03.021. [доступ 17 сентября 2017] Адрес: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2011.03.021>
 41. Pang Y.Y., Schwartz J., Bloomberg S., Boyd J.M., Horswill A.R., Nauseef W.M. Methionine sulfoxide reductases protect against oxidative stress in staphylococcus aureus encountering exogenous oxidants and human neutrophils. *J. Innate Immun.* 2014; 6(3): 353–64. doi: 10.1159/000355915. [доступ 17 сентября 2017] Адрес: <https://www.karger.com/Article/FullText/355915>
 42. Nishimura Y., Lee H., Hafenstein S., Kataoka C., Wakita T., Bergelson J.M., Bergelson J.M., Shimizu H. Enterovirus 71 binding to PSGL-1 on leukocytes: VP1–145 acts as a molecular switch to control receptor interaction. *PLoS Pathog.* 2013; 9(7): e1003511. doi: 10.1371/journal.ppat.1003511. [доступ 17 сентября 2017] Адрес: <http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1003511>
 43. Lee L.Y., Höök M., Haveland D., Wetsel R.A., Yontner E.O., Syribeys P., Vernachio J., Brown E.L. Inhibition of complement activation by a secreted *Staphylococcus aureus* aureus protein. *J. Infect. Dis.* 2004; 190(3): 571–9. doi: 10.1086/422259.
 44. Higgins J., Loughman A., Van Kessel K.P., Van Strijp J.A., Foster T.J. Clumping factor A of *Staphylococcus aureus* inhibits phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. *FEMS Microb. Lett.* 2006; 258(2): 290–6. doi: 10.1111/j.1574–6968.2006.00229.x.
 45. Postma B., Poppelier M.J., van Galen J.C., Prossnitz E.R., van Strijp J.A., de Haas C.J., van Kessel, K.P. Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* binds specifically to the C5a and formylated peptide receptor. *J. Immunol.* 2004; 172(11): 6994–7001. doi: 10.4049/jimmunol.172.11.6994.
 46. van Wamel W.J., Rooijackers S.H., Ruyken M., van Kessel K.P., van Strijp J.A. The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on β -hemolysin-converting bacteriophages. *J. Bacteriol.* 2006; 188(4): 1310–5. doi: 10.1128/JB.188.4.1310–1315.2006. [доступ 18 сентября 2017] Адрес: <http://jb.asm.org/content/188/4/1310.long>
 47. Gustafsson E., Rosén A., Barchan K., van Kessel K.P., Haraldsson K., Lindman S., et al. Directed evolution of chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* generates biologically functional variants with reduced interaction with human antibodies. *Protein Eng. Des. Sel.* 2010; 23(2): 91–101. doi: 10.1093/protein/gzr062. [доступ 17 сентября 2017] Адрес: <http://paperity.org/p/41905982/directed-evolution-of-chemotaxis-inhibitory-protein-of-staphylococcus-aureus-generates>
 48. Thammavongsa V., Missiakas D.M., Schneewind O. *Staphylococcus aureus* degrades neutrophil extracellular traps to promote immune cell death. *Science.* 2013; 342(6160): 863–6. doi: 10.1126/science.1242255.
 49. Abate F., Malito E., Falugi F., Margarit Y Ros I., Bottomley M.J. Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of SpyCEP, a candidate antigen for a vaccine against *Streptococcus pyogenes*. *Acta Cryst.* 2013; 69(Pt10): 1103–6. doi: 10.1107/S1744309113024871. [доступ 17 сентября 2017] Адрес: <http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S1744309113024871>
 50. Lázaro-Díez M., Chapartegui-González I., Redondo-Salvo S., Leigh C., Merino D., San Segundo D., et al. Human neutrophils phagocytose and kill *Acinetobacter baumannii* and *A. pittii*. *Sci. Rep.* 2017; 7: 4571. doi: 10.1038/s41598–017–04870–8.
 51. Feng S., Bowden N., Fragiadaki M., Souilhol C., Hsiao S., Mahmoud M., Allen S., Pirri D., Aylton B.T., Akhtar S., Thompson A.A., Jo H., Weber C., Ridger V., Schober A., Evans P.C. Mechanical Activation of Hypoxia-Inducible Factor 1 α Drives

- Endothelial Dysfunction at Atheroprone Sites. *Arterioscler. Thromb Vasc. Biol.* 2017 Sep 7. pii: ATVBAHA.117.309249. doi: 10.1161/ATVBAHA.117.309249.
52. Guo X., Zhu Z., Zhang W., Meng X., Zhu Y., Han P., et al. Nuclear translocation of HIF-1 α induced by influenza A (H1N1) infection is critical to the production of proinflammatory cytokines. *Emerg Microbes Infect.* 2017; 6(5): e39. doi: 10.1038/emi.2017.21. [доступ 17 сентября 2017] Адрес: <https://www.nature.com/emi/journal/v6/n5/full/emi201721a.html>
53. Niyonsaba F., Madera L., Afacan N., Okumura K., Ogawa H., Hancock R.E. The innate defense regulator peptides IDR-HH2, IDR-1002, and IDR-1018 modulate human neutrophil functions. *J. Leukoc. Biol.* 2013; 94(1): 159–70. doi: 10.1189/jlb.1012497.
54. Corriden R., Hollands A., Olson J., Derieux J., Lopez J., Chang J.T., Nizet V. Tamoxifen augments the innate immune function of neutrophils through modulation of intracellular ceramide. *Nat. Commun.* 2015; 6: 8369. doi: 10.1038/ncomms9369. [доступ 17 сентября 2017] Адрес: <https://www.nature.com/articles/ncomms9369>
55. Hollands A., Corriden R., Gysler G., Dahesh S., Olson J., Raza Ali S., Kunkel M.T., Lin A.E., Forli S., Newton A.C., Kumar G., Nair B.G., Perry J.J.P., Nizet V. Natural product anacardic acid from cashew nut shells stimulates neutrophil extracellular trap production and bactericidal activity. *J. Biol. Chem.* 2016; 291(27): 13964–73. doi: 10.1074/jbc.M115.695866. [доступ 17 сентября 2017] Адрес: <http://www.jbc.org/content/291/27/13964.long>

MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF THE PROTECTIVE MECHANISMS OF NEUTROPHILS AGAINST BACTERIAL INFECTIONS AND THEIR CONTRIBUTION IN THE PATHOGENESIS OF PRO-INFLAMMATORY REACTIONS

E. V. Matosova, B. G. Andryukov

E-mail: e_matosova@mail.ru

Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia

Received: 13.10.2017. Accepted: 25.12.2017

Infection is one of the leading causes of mortality and morbidity in the world. Neutrophils are an active and numerous effector link in the innate immune system, which protects the body from infection with pathogenic microorganisms. However, the contribution of neutrophils in the development of the infectious process was underestimated, despite the fact that the functions of this subclass of leukocytes have long been known as a pathogenetic element of inflammation. In addition to phagocytosis, these cells can mediate lesser-characterized antibacterial strategies – extracellular degranulation, and also, by releasing extracellular chromatin, nuclear protein and serine proteases, to form web-like fiber structures called neutrophilic extracellular traps (NETs). NETs can capture pathogens, cause endothelial dysfunction and pro-inflammatory immune responses. The phenomenon of NETs is a relatively new form of programmed cell death (NETosis), the significance of which in the development of the infectious process and the development of inflammation is not fully understood. NETosis has a high potential for further study of the pathogenesis of inflammation and the search for effective methods of treating infections. This review focuses on modern data on the basic protective strategies of neutrophils against bacterial infections and their contribution to the pathogenesis of proinflammatory reactions. Modern approaches to pharmacological modulation of various variants of antimicrobial mechanisms of neutrophils are discussed, which is promising in cases of complex treatment of infections associated with antibiotic-resistant strains of bacteria.

Key words: infectious diseases, neutrophils, inflammation, antibiotic resistance, phagocytosis, degranulation, neutrophilic extracellular traps (NETs)

Authors:

Matosova E.V.  Junior Researcher of the Laboratory of Molecular Epidemiology and Microbiology, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia. 690087, Vladivostok, Sel'skaya, 1. Tel.: 8 (423) 244–26–04(off.). E-mail: e_matosova@mail.ru.

Andryukov B.G., MD, Leading Researcher of the Laboratory of Molecular Epidemiology and Microbiology, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia.