

© МАТОСОВА Е.В., АНДРЮКОВ Б.Г., 2017

УДК 616.9-022.7-092:612.112.91

Матосова Е.В., Андрюков Б.Г.

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

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова»,
690087, г. Владивосток, Россия

Инфекции – одна из основных причин смертности и заболеваемости в мире. Нейтрофилы являются активным и многочисленным эффекторным звеном врождённой иммунной системы, которое защищает организм от инфицирования патогенными микроорганизмами. Однако вклад нейтрофилов в развитие инфекционного процесса был недооценён, несмотря на то, что функции этого подкласса лейкоцитов давно известны в качестве патогенетического элемента воспаления. В дополнение к фагоцитозу эти клетки могут опосредовать менее изученную в качестве антибактериальной стратегии внеклеточную дегрануляцию, а также, высвобождая внеклеточный хроматин, ядерный белок и сериновые протеазы, образовывать сетчатые волоконные структуры, называемые нейтрофильными внеклеточными ловушками (Neutrophil Extracellular Traps – 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.

Для цитирования: Матосова Е.В., Андрюков Б.Г. Морфофункциональная характеристика защитных механизмов нейтрофилов при бактериальных инфекциях и их вклад в патогенез провоспалительных реакций. *Гематология и трансфузиология*. 2017; 62(4): 223-229. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730-2017-62-4-223-229>

Matosova E.V., Andryukov B.G.

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

Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, 690087, Russian Federation

Infection is one of the leading causes of the mortality and morbidity. Neutrophils protect the body against pathogenic microorganisms. However, the contribution of neutrophils in the development of the infectious process was underestimated. In addition to phagocytosis, neutrophils can mediate extracellular degranulation, release of extracellular chromatin, nuclear protein and serine proteases and form neutrophil 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). NETosis has a high potential for the 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 responses. Approaches to pharmacological modulation of different antimicrobial mechanisms of neutrophils are discussed.

Key word: infectious diseases; neutrophils; inflammation; antibiotic resistance; phagocytosis; degranulation; neutrophilic extracellular traps (NETs); review.

For citation: Matosova E.V., Andryukov B.G. Morphofunctional characteristics of protective mechanisms of neutrophils against bacterial infections and their contribution in pathogenesis of pro-inflammatory responses. *Russian journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i Transfusiology)*. 2017; 62(4): 223-229. (in Russian). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730-2017-62-4-223-229>

Acknowledgments. This work was supported by the Comprehensive Program of Basic Research of the Far East Branch of the Russian Academy of Sciences "Far East", project No. 18-5-099.

Acknowledgments. The authors express their gratitude to Bynina Marina Pavlovna, the junior researcher of the Laboratory of Molecular Epidemiology and Microbiology of Somov Institute of Epidemiology and Microbiology for her help in the preparation of materials.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 24 Nov 2017

Accepted 29 Dec 2017

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. Пул этих клеток образуется и созревает в костном мозге. Примерно 100 млрд нейтрофилов ежедневно высвобождаются в периферическую кровь и выходят из нее в ткани, опосредуя иммунные реакции, которые играют решающую роль против 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 (Toll-like receptors – 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 сложный многоступенчатый 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 антимикробные стратегии для выполнения защитной 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].

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 работы – анализ современных данных об основных защитных стратегиях нейтрофилов при бактериальных инфекциях и их вкладе в патогенез провоспалительных реакций.

Фагоцитирование нейтрофилами патогенных бактерий

Фагоцитарная теория «целевой 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: иницирование адгезии нейтрофилов к активированным эндотелиальным клеткам, проникновение через сосудистую стенку и их миграция к месту заражения [6, 11].

Процесс фагоцитоза протекает в несколько этапов: хемотаксис (направленная миграция нейтрофилов к бактериям),

распознавание рецепторов, активация клеток, поглощение и переваривание бактерий [8, 12, 13].

Хемотаксис зависит от градиентов концентрации хемоаттрактантов (эндогенных и экзогенных), которые определяют направленное движение фагоцитов [10, 2, 13]. В качестве хемоаттрактантов могут выступать молекулы, высвобождаемые при гибели клеток, биоактивные пептиды (лейкотриены – LT_{B4}), хемокины (IL-8, CXCL2, CXCL1) или провоспалительные цитокины (IL-1 β , TNF α), продуцируемые стромальными, эпителиальными и иммунными клетками [13, 14].

Узнавание бактерий нейтрофилами основано на обнаружении поверхностных и внутриклеточных рецепторов. Нейтрофилы распознают чужеродные объекты с помощью рецепторов – pattern recognition receptors (PRR) [11, 15]. В человеческом организме наиболее значимыми нейтрофильными структурами подобного типа являются 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 (греч.: «подготовка к обеду») патогенов является мощным усилителем активности фагоцитоза. Она происходит с участием классических опсонин IgG и C3b и нейтрофильных рецепторов к ним, посредством которых фагоциты способны различать бактерии: Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII, и лектинов C-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].

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 [21, 22]. В последние десятилетия с использованием протеомного анализа исследователям удалось идентифицировать и охарактеризовать около 30 гранулярных белков, обладающих антимикробной активностью. Некоторые из них представлены в **таблице**. Гранулы делятся на четыре типа: первичные (азурофильные), возникающие в процессе дифференцировки на стадии промиелоцита; вторичные (специфические), возникающие при трансформации нейтрофилов в миелоциты; желатиновые 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 диapedеза 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

Для корреспонденции:

Матосова Екатерина Владимировна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и микробиологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, 690087, г. Владивосток, Россия. E-mail: e_matosova@mail.ru

For correspondence:

Matosova Ekaterina V., MD, junior researcher of the Laboratory of Molecular Epidemiology and Microbiology, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, 690087, Russian Federation. E-mail: e_matosova@mail.ru

Information about authors:

Matosova E.V., <http://orcid.org/0000-0001-9968-3347>;
Andryukov B.G., <http://orcid.org/0000-0003-4456-808X>.

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 трансмембранных пор	Участвуют в выработке ROS	Вторичные гранулы, NETs
Бактерицидный белок, повышающий проницаемость	Нейтрализация эндотоксинов Грам(-) флоры	Ингибируют цитокины, активируют апоптоз бактерий	Первичные гранулы
Гистоны	Активация мембран	Формирование NETs	Ядро, NETs
Лизоцимы	Деградация бактериальных мембран	Формирование NETs	Лизосомы
Протеиназа-3	Активация протеолиза, деградация факторов вирулентности	Формирование NETs	Первичные гранулы, NETs
Нейтрофильная эластаза	Активация протеолиза, деградация факторов вирулентности	Формирование NETs	Первичные гранулы, NETs
Катепсин G	Активация протеолиза	Формирование NETs	Первичные гранулы, NETs
Сериновая протеаза 4	Трипсин-подобный	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 перекисное окисление липидов	Первичные гранулы
Кальпротектин (S100A, calgranulin)	Связывает марганец и цинк, лишая бактерии нужных микроэлементов	Формирование NETs, является маркером воспаления в пищеварительном тракте	Вторичные гранулы, 60% цитозольных белков
NADPH oxidase	Генерирует ROS в фагосомах	Формирование NETs, инициация перекисного окисления липидов	Вторичные гранулы, плазматическая мембрана
Миелопероксидаза	Образует хлорноватистую кислоту, обладающую мощной антимикробной активностью	Формирование NETs	Первичные гранулы, лизосомы

мембраной образуются рецепторы плазматической мембраны нейтрофила [21, 22, 24].

R. Nordenfelt и соавт. [25] показали, что процесс поглощения опсонизированных частиц при нейтрофильном фагоцитозе происходит менее чем за 20 с. 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 2-дневной 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 внеклеточное пространство 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 показателем 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 сопровождается структурными изменениями актинового цитоскелета клетки и сигналами рецепторного аппарата [9, 14, 27].

Эта антимикробная стратегия нейтрофилов является прогностическим показателем риска генерализации воспалительного процесса [9, 14, 28]. Кроме того дегрануляция выполняет триггерную функцию в развитии 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 отмечено активное участие содержимого гранул, секрета которого активно происходит в процессе фагосомно-лизосомального слияния. В связи с появлением и развитием новых методов молекулярно-клеточной биологии были получены многочисленные данные об автономности экзоцитоза, которые позволили выделить дегрануляцию в качестве отдельной антибактериальной стратегии.

Обнаружение и количественное определение в плазме крови гранулярных энзимов и антимикробных пептидов используется в клинических и научных исследованиях различных физиологических и патологических процессов. 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, 14, 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 феноменом дегрануляции нейтрофилов связывается формирование более напряженного иммунитета [19, 30], а количественные маркеры интенсивности дегрануляции могут рассматриваться в качестве показателей иммуногенной активности

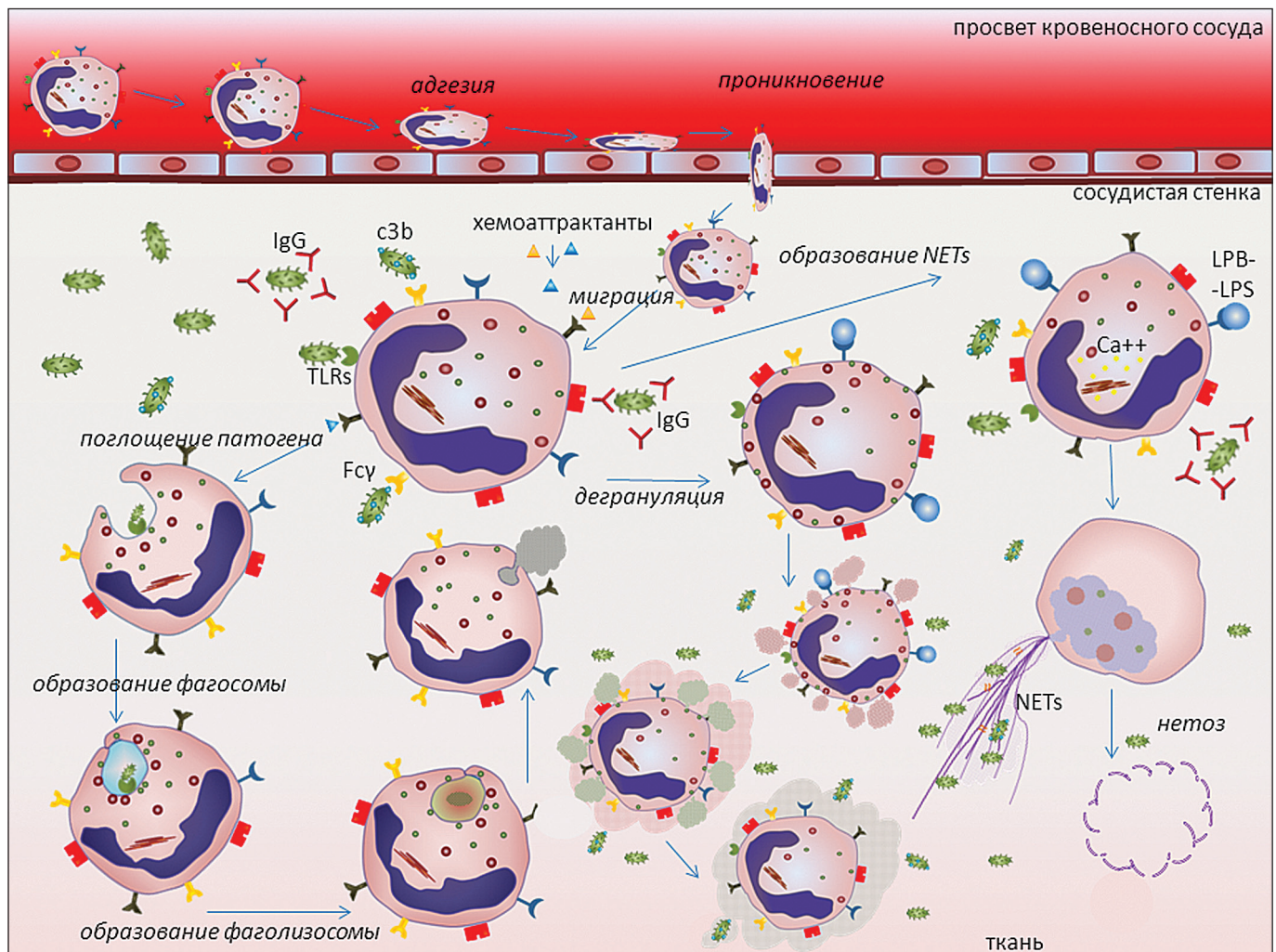


Рис. 1. Антибактериальные стратегии нейтрофилов.

бактериальных вакцин [9, 19]. Дегрануляция нейтрофилов запускается при их активации молекулярными паттернами грамотрицательных бактерий – липополисахаридами (LPS) [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].

I. Naegelen и соавт. [29] изучали динамику секреции активированными нейтрофилами цитокинов и эффект дегрануляции гранулоцитов и обнаружили, что секреция цитотоксических белков, содержащихся в гранулах, и цитокинов активированными нейтрофилами, обнаруженными в очагах инфекции, имеет выраженные кумулятивный и синергический эффекты, влияющие на формирование воспаления в окружающих тканях. Это подтверждает результаты, полученные K. Malcolm и соавт. [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 [9, 13, 19]. 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, 13], естественными клетками-киллерами [10, 19], макрофагами [13, 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, 13, 19].

Формирование нейтрофильных внеклеточных ловушек, убивающих бактерии

Кроме фагоцитоза и внеклеточной дегрануляции нейтрофилы проявляют антибактериальную активность посредством образования внеклеточных сетей-ловушек (neutrophil extracellular traps – NETs), которые были впервые описаны V. Brinkmann и соавт. [32, 33].

При формировании NETs происходит выбрасывание на скопление бактерий сетчатых 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 – MPO 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 B. Amulic и соавт. [40], показали, что активация эндотелиальных клеток и чрезмерное образование NETs лежат в основе патогенеза преэклампсии у беременных.

Механизмы резистентности бактерий к защитным стратегиям нейтрофилов

В процессе эволюции бактерии выработали набор 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 гликопротеинового лиганда Р-селектина 1 (PSGL-1) [41]. Аналогичный механизм был впоследствии обнаружен и у других бактерий и вирусов [42]. Кроме того, выявлено, что белки SSL5, SSL7 и SSL8 также ингибируют реакции нейтрофилов на некоторые хемокины и компоненты комплемента C3а и C5а.

В конце XX века во многих патогенных штаммах *S. aureus* был обнаружен белок внеклеточного прилипания (extracellular adherence protein – 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), свободно секретируемый *S. aureus*, непосредственно связывает и блокирует рецепторы C5а (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. Одним из наиболее распространенных механизмов является экспрессия нуклеаз, которые способны вызывать деградацию NETs [48], а также ингибировать образование NETs путем деградации нейтрофил-стимулирующего хемокина IL-8 с участием пептидазы SpyCER [49, 50].

Несмотря на признание центральной роли фагоцитоза и врожденной иммунной системы в защите от бактериальных инфекций, разработка тактики их лечения остается ориентирован-

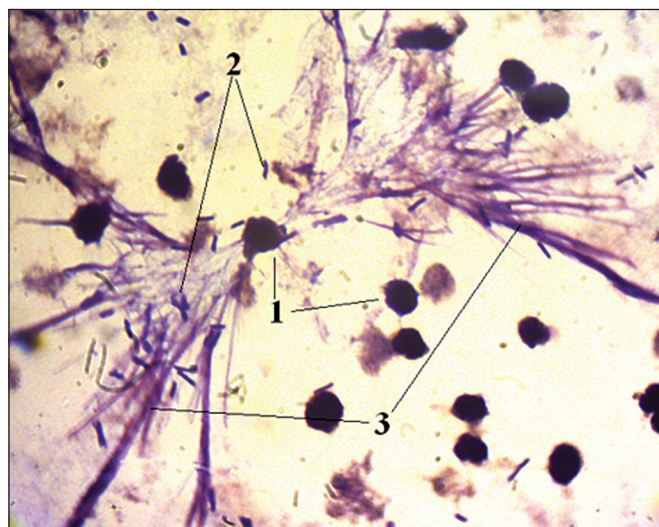


Рис. 2. Нейтрофильная внеклеточная ловушка. Световая микроскопия.

Окрашивание по Романовскому–Гимзе. Ув. 1500.

1 – нейтрофильный гранулоцит; 2 – бактериальные клетки; 3 – волокна деконденсированного хроматина с прикрепленными белками.

ной на антибиотикотерапию. Взаимодействие между нейтрофилами и патогенными бактериями по сей день остается интересной и до конца не изученной составляющей 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



Рис. 3. Бактериальное ингибирование механизмов ключевых этапов фагоцитоза.

заболеваний, следует отметить индуцируемый гипоксией фактор 1 (HIF-1) [51, 52], врожденные защитные регуляторы пептидов (IDR-HH2, IDR-1002 и IDR-1018) [16, 53] и витамин B₃, 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 (фактор некроза опухоли – Tumor Necrosis Factor, TNF и интерлейкин 10 – IL-10), что позволяет снизить воспаление. Фармакологические препараты тамоксифен [54] или анакардиновая кислота [55] индуцируют формирование NETs и нейтрофильный фагоцитоз.

Озабоченность общества по поводу стремительного роста антибиотикорезистентности патогенных бактерий заставляет иначе взглянуть на роль нейтрофилов и влияние их функциональной активности и антибактериальных стратегий на эффективность антибиотикотерапии. Традиционные рекомендации по применению антибиотиков в отношении доз, способов и кратности введения основаны на фармакокинетике и фармакодинамике этой группы препаратов, показанных 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.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*. 2010; 33(5): 657–70. doi: 10.1016/j.immuni.2010.11.011.
- 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.
- Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* 2006; 6(3): 173–82. doi: 10.1038/nri1785.
- 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.
- Segal A.W. How neutrophils kill microbes. *Annu. Rev. Immunol.* 2005; 23: 197–223. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115653. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2092448/> (accessed 11 Sept 2017).
- 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.
- Döhrmann S., Cole J.N., Nizet V. Conquering neutrophils. *PLoS Pathog.* 2016; 12(7): e1005682. doi: 10.1371/journal.ppat.1005682. Available at: <http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1005682> (accessed 11 Sept 2017).
- Nauseef W.M. Neutrophils, from cradle to grave and beyond. *Immunol. Rev.* 2016; 273(1): 5–10. doi: 10.1111/imr.12463.
- 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. Available at: <https://www.nature.com/cr/journal/v20/n1/full/cr2009139a.html> (accessed 11 Sept 2017).
- 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. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00467/full> (accessed 11 Sept 2017).
- 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.
- 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. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00281-011-0295-3> (accessed 11 Sept 2017).
- 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.
- Mucsaí A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J. Exp. Med.* 2013; 210(7): 1283–99. doi: 10.1084/jem.2012220. Available at: <http://jem.rupress.org/content/210/7/1283.long> (accessed 11 Sept 2017).
- 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.
- 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.0000000000000096.
- 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. Available at: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2349817> (accessed 11 Sept 2017).
- 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. Available at: <http://www.cell.com/action/showImagesData?pii=S1931-3128%2814%2900145-0> (accessed 11 Sept 2017).
- Klebanoff S.J. Myeloperoxidase: friend and foe. *J. Leukoc. Biol.* 2005; 77(5): 598–625.
- Dapunt U., Hansch G.M., Arciola C.R. Innate Immune Response in Implant-Associated Infections: Neutrophils against Biofilms. *Materials*. 2016; 9(5): 387. Available at: <http://www.mdpi.com/1996-1944/9/5/387/htm> (accessed 11 Sept 2017).
- 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.
- 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.
- Cardot-Martin E., Casalegno J.S., Badiou C., Dauwalder O., Keller D., Prévost G., et al. α -defensins partially protect human neutrophils against Pantón-Valentine leukocidin produced by *Staphylococcus aureus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 2015; 61(2): 158–64. doi: 10.1111/lam.12438.
- 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.
- Nordenfelt P., Tapper H.J. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 2011; 90(2): 271–84. doi: 10.1189/jlb.0810457.
- Chebotaev I.V. Mechanisms of antibacterial immunity. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2012; 67(12): 22–9. doi: 10.15690/vramm.v67i12.477. (in Russian)
- Schuerholz T., Brandenburg K., Marx G. Antimicrobial peptides and their potential application in inflammation and sepsis. *Crit. Care*. 2012; 16(2): 207. doi: 10.1186/cc11220. Available at: <https://doi.org/10.1186/cc11220> (accessed 11 Sept 2017).
- Cojocaru I.M., Cojocaru M., Burcin C. Evaluation of granulocyte elastase as a sensitive diagnostic parameter of inflammation in first ischemic stroke. *Rom. J. Intern. Med.* 2006; 44(3): 317–21. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18386609> (accessed 11 Sept 2017).
- Nagegen 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. Available at: <https://www.hindawi.com/journals/jir/2015/817038/> (accessed 11 Sept 2017).
- 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. U.S.A.* 2000; 97(15): 8245–50. Available at: <http://www.pnas.org/content/97/15/8245.long> (accessed 11 Sept 2017).
- 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. Available at: <http://www.jbc.org/content/278/18/15693.long> (accessed 11 Sept 2017).
- Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004; 303(5663): 1532–5.
- Brinkmann V., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J. Cell Biol.* 2012; 198(5): 773–83. doi: 10.1083/jcb.108.050701. Available at: <http://jcb.rupress.org/content/198/5/773.long> (accessed 11 Sept 2017).
- 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.
- Theeb W., Sellau J., Steeg C., Klinken A., Baldus S., Cramer J.P., et al. Myeloperoxidase attenuates pathogen clearance during *Plasmodium yoelii* nonlethal infection. *Infect. Immun.* 2016; 85(1): e00475–16. Available at: <http://iaa.asm.org/content/85/1/e00475-16.long> (accessed 11 Sept 2017).
- Delgado-Rizo V., Martinez-Guzman M.A., Iniguez-Gutierrez L., Garcia-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. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.00081/full> (accessed 11 Sept 2017).
- 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; 7: 302. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2016.00302/full> (accessed 11 Sept 2017).
- 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.
- Koymans K.J., Feitsma L.J., Brondijk T.H., Aerts P.C., Lukkien E., Lössl P., et al. Structural basis for inhibition of TLR2 by staphylococcal superantigen-like protein 3 (SSL3). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2015; 112(35): 11018–23.
- Amulic B., Hayes G. Neutrophil extracellular traps. *Curr. Biol.* 2011; 21(9): R297–8.
- 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.
- Nishimura Y., Lee H., Hafenstein S., Kataoka C., Wakita T., Bergelson J.M., et al. 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. Available at: <http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1003511> (accessed 11 Sept 2017).
- Lee L.Y., Höök M., Haviland D., Wetzel R.A., Yonter E.O., Strybeys P., et al. Inhibition of complement activation by a secreted *Staphylococcus aureus* protein. *J. Infect. Dis.* 2004; 190(3): 571–9.
- 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.
- Postma B., Poppelier M.J., van Galen J.C., Prossnitz E.R., van Strijp J.A., de Haas C.J., et al. Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* binds specifically to the C5a and formylated peptide receptor. *J. Immunol.* 2004; 172(11): 6994–7001.

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.
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.
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(Pt 10): 1103–6. doi: 10.1107/S1744309113024871. Available at: <http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S1744309113024871> (accessed 11 Sept 2017)
50. Lazaro-Diez M., Chapartegui-Gonzalez I., Redondo-Salvo S., Leigh C., Merino D., Segundo D., et al. Human neutrophils phagocytose and kill *Acinetobacter baumannii* and *A. pittii*. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 4571. doi: 10.1038/s41598-017-04870-8.
51. Feng S., Bowden N., Fragiadaki M., Souilhol C., Hsiao S., Mahmoud M., et al. Mechanical activation of hypoxia-inducible factor 1 α drives endothelial dysfunction at atheroprone sites. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2017; 37(11): 2087–2101. 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. Available at: <https://www.nature.com/emi/journal/v6/n5/full/emi201721a.html> (accessed 11 Sept 2017)
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., et al. Tamoxifen augments the innate immune function of neutrophils through modulation of intracellular ceramide. *Nat. Commun.* 2015; 6: 8369. doi: 10.1038/ncomms9369. Available at: <https://www.nature.com/articles/ncomms9369> (accessed 11 Sept 2017)
55. Hollands A., Corriden R., Gysler G., Dahesh S., Olson J., Raza Ali S., et al. Natural product anacardic acid from cashew nut shells stimulates neutrophil extracellular trap production and bactericidal activity. *J. Biol. Chem.* 2016; 291(27): 13964–73.

Поступила 24.11.17

Принята к печати 29.12.17

КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.155.191-085

Меликян А.Л., Суборцева И.Н., Гилязитдинова Е.А., Ковригина А.М., Судариков А.Б., Абдуллаев А.О.

ТЕРАПИЯ ИСТИННОЙ ПОЛИЦИТЕМИИ РУКСОЛИТИНИБОМ

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России,
125167, г. Москва, Россия

В настоящее время методами воздействия при истинной полицитемии (ИП) являются: профилактика тромботических осложнений (препараты ацетилсалициловой кислоты); физическое удаление избыточной массы циркулирующих эритроцитов (кровопускание или эритроцитаферез); циторедуктивная терапия; лечение тромботических осложнений; терапия в особых ситуациях (при беременности, хирургических вмешательствах). В качестве 1-й линии лечения в молодом возрасте показан интерферон α , в старшей возрастной группе – гидроксикарбамид. В 15–25% случаев данные препараты имеют малую эффективность и плохую переносимость. Переход на другую линию показан в случае неэффективности или непереносимости проводимой терапии. Результаты клинических исследований доказали эффективность ингибитора JAK2 руksолитиниба в купировании массивной спленомегалии и конституциональных симптомов у больных первичным миелофиброзом и ИП. Представлен обзор литературы и описание клинического случая эффективного лечения больного ИП руksолитинибом.

Ключевые слова: миелопролиферативные неоплазии; истинная полицитемия; JAK2V617F; руksолитиниб.

Для цитирования: Меликян А.Л., Суборцева И.Н., Гилязитдинова Е.А., Ковригина А.М., Судариков А.Б., Абдуллаев А.О. Терапия истинной полицитемии руksолитинибом. *Гематология и трансфузиология.* 2017; 62(4): 229–232. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730-2017-62-4-229-232>

Melikyan A.L., Subortseva I.N., Gilyazitdinova E.A., Kovrigina A.M., Sudarikov A.B., Abdullaev A.O.

THERAPY OF THE POLYCYTHEMIA VERA WITH RUXOLITINIB

National Research Center for Hematology, Moscow, 125167, Russian Federation

Currently, methods of therapeutic the treatment of polycythemia vera (PV) are: prophylaxis of thrombotic complications with acetylsalicylic acid; erythrocytapheresis; cytoreductive therapy; treatment of thrombotic complications; therapy in special conditions (pregnancy, surgery). The first line of the treatment at a young age is interferon α , in the older age group is hydroxycarbamide. In 15–25% of cases, these drugs have low efficiency and poor tolerance. The transition to another line is indicated if the therapy is ineffective or patient is intolerant of the therapy. Results of clinical trials have proved the effectiveness of ruxolitinib, JAK2 inhibitor, in the management of splenomegaly and constitutional symptoms in patients with primary myelofibrosis and PV. A review of the literature and a description of the clinical case of the effective treatment of the PV patient ruxolitinib is presented.

Key words: myeloproliferative neoplasia; true polycythemia; JAK2V617F; ruxolitinib.

For citation: Melikyan A.L., Subortseva I.N., Gilyazitdinova E.A., Kovrigina A.M., Sudarikov A.B., Abdullaev A.O. Therapy of polycythemia vera with ruxolitinib. *Russian Journal of Hematology and transfusiology (Gematologiya i Transfusiologya).* 2017; 62(4): 229–232. (in Russian). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730-2017-62-4-229-232>

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

Received 19 Dec 2017

Accepted 29 Dec 2017