

Министерство здравоохранения Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Северный государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Н.А. Воробьева, Т.Е. Кисина

**НЕЙТРОФИЛЬНЫЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ
ЛОВУШКИ: МЕХАНИЗМ ОБРАЗОВАНИЯ
И ФУНКЦИИ, РОЛЬ В ВОСПАЛЕНИИ**

Учебное пособие

Архангельск
2023

УДК 612.112.91:616-002
ББК 28.707.3
В 75

Авторы: *Н.А. Воробьева*, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой клинической фармакологии и фармакотерапии Северного государственного медицинского университета; *Т.Е. Кисина*, кандидат биологических наук, доцент кафедры клинической фармакологии и фармакотерапии Северного государственного медицинского университета

Рецензенты: *О.А. Мирюлюбова*, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой факультетской терапии Северного государственного медицинского университета; *Н.В. Бедило*, кандидат медицинских наук, заведующая централизованной клинико-диагностической лабораторией ПГКБ им. Е.Е. Волосевич (г. Архангельск)

Печатается по решению редакционно-издательского совета
Северного государственного медицинского университета

Воробьева Н.А.

В 75 **Нейтрофильные внеклеточные ловушки: механизм образования и функции, роль в воспалении: учебное пособие / Н.А. Воробьева, Т.Е. Кисина. – Архангельск: Изд-во Северного государственного медицинского университета, 2023. – 75 с.**
ISBN 978-5-91702-509-4

В учебном пособии представлена актуальная информация о роли нейтрофильных ловушек в физиологии, патогенезе заболеваний, инфекционном процессе, при COVID-19. Рассмотрены методы лабораторной детекции, подходы к терапии заболеваний, связанных с активацией нейтрофильных ловушек.

Пособие предназначено для обучающихся по образовательным программам 31.05.01 «Лечебное дело», изучающих дисциплину «Лабораторный мониторинг фармакотерапии», и 30.05.01 «Медицинская биохимия», изучающих дисциплину «Клиническая лабораторная гемостазиология».

УДК 612.112.91 : 616-002
ББК 28.707.3

ISBN 978-5-91702-509-4

© Воробьева Н.А., Кисина Т.Е.,
2023

© Северный государственный
медицинский университет, 2023

Оглавление

Введение	4
Раздел 1. Основные положения физиологии иммунной системы.....	6
Раздел 2. Морфология и физиология зрелого нейтрофильного гранулоцита	10
Раздел 3. Нейтрофильные внеклеточные ловушки.....	19
Раздел 4. Роль нейтрофильных ловушек при инфекциях.....	29
Раздел 5. Роль нейтрофильных ловушек при инфекции COVID-19.....	32
Раздел 6. Роль нейтрофильных ловушек в патогенезе сепсиса	39
Раздел 7. Роль нейтрофильных ловушек в патогенезе аутоиммунных и аутовоспалительных заболеваний.....	42
Раздел 8. Роль нейтрофильных ловушек при онкологических заболеваниях	46
Раздел 9. Роль нейтрофильных ловушек в патологии тромбообразования	50
Раздел 10. Методы детекции внеклеточных нейтрофильных ловушек.....	58
Раздел 11. Подходы к фармакотерапии, направленные на нейтрофильные ловушки	63
Контрольные вопросы для самоконтроля.....	66
Список рекомендуемой литературы.....	67

Нейтрофильные гранулоциты (или полиформноядерные лейкоциты) являются клетками первой (неспецифической) линии защиты организма от инфекций. От фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов зависит активность элиминации возбудителя¹. Главной функцией нейтрофильных гранулоцитов является быстрое уничтожение патогенов для предотвращения их размножения, поэтому эти клетки должны реагировать на внедрившийся патоген быстро и сильно². Ранее считалось, что функциональная роль нейтрофилов ограничивается только фагоцитозом инфекционных агентов. Впоследствии фагоцитарный процесс стал рассматриваться как более сложный многоступенчатый процесс, связанный с элементами специфического иммунного реагирования: при проникновении микроба во внутреннюю среду организма нейтрофильные гранулоциты взаимодействуют с другими иммунными клетками (антигенпрезентирующими клетками, лимфоцитами) и с гуморальными факторами, выделяемыми ими.

Нейтрофилы помимо поглощения и киллинга бактерий, характеризуются другой важной функцией: они сами являются мощными продуцентами иммунорегуляторных веществ – цитокинов (IL-1 β , IL-8, IL-12, PAF, IFN γ), с помощью которых активируются и вовлекаются в борьбу с возбудителем новые клетки, прибывшие в очаг воспаления³. Секретируемые в большом количестве активированными нейтрофилами медиаторы способствуют созреванию, дифференцировке, активации клеток врожденного и, в особенности, адаптивного иммунитета. Вещества, вызывающие хемотаксис клеток в очаг воспаления – хемокины, выделяемые НГ при попадании в организм чужеродных структур, взаимодействуют с рецепторами на поверхности

¹ Фрейдлин И.С. Иммунная система и ее дефекты: Руководство для врачей. СПб., 1998. – 113 с. – ISBN 5-230-08852-4.

² Edwards, S. (1994). Contents. In *Biochemistry and Physiology of the Neutrophil* (pp. V-Xi). Cambridge: Cambridge University Press.

³ Хайтов Р.М. Современные представления о защите организма от инфекции / Р.М. Хайтов, Б.В. Пинегин // *Иммунология*. 2000. – № 1. – С. 61–64.

других клеток иммунной системы, инициируя миграцию последних к месту инвазии патогенов. Нейтрофильные гранулоциты в последнее время признаются важной составляющей эффекторных и регуляторных цепей, контролирующих величину и качество иммунного ответа. Они обладают широким спектром механизмов, способствующих привлечению эффекторов адаптивного иммунитета к очагу воспаления, индукции их созревания, дифференцировки, пролиферации и активации. Поскольку нейтрофилы являются преобладающим типом клеток в поврежденных и воспаленных тканях, растворимые медиаторы, выделяемые ими, играют ключевую роль в формировании микроокружения и моделировании специфического антигензависимого ответа. Нейтрофилы опосредуют разнообразные иммунные функции, высвобождая широкий спектр преформированных и вновь синтезируемых медиаторов, включая цитокины и хемокины. НГ оказывают иммунорегуляторное воздействие на широкий диапазон иммунокомпетентных клеток (дендритные клетки, НК- и Т- и В-лимфоциты), поддерживая их гомеостаз за счет секреции широкого спектра цитокинов. Нарушение функции НГ может приводить к неадекватной активации эффекторов адаптивного иммунного ответа и развитию патологических состояний, угрожающих жизни и здоровью пациентов⁴.

В последние годы внимание исследователей привлекают сетчатые структуры, состоящие из ядерного хроматина и гранул антимикробных протеинов, названные нейтрофильными внеклеточными ловушками (NET – neutrophil extracellular traps). Нейтрофилы могут усиливать свои защитные функции с помощью формирования нейтрофильных внеклеточных ловушек.

⁴ Беляева Анастасия Сергеевна, Ванько Л.В., Матвеева Н.К., Кречетова Л.В. Нейтрофильные гранулоциты как регуляторы иммунитета // Иммунология. 2016. № 2.

РАЗДЕЛ 1. ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ ФИЗИОЛОГИИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

Во внутренней среде организма присутствуют клетки и молекулы, которые специализируются на защитной функции. Часть из них являются механизмами врожденного иммунитета, т.е. присутствуют в организме еще до встречи с каким-либо болезнетворным микроорганизмом или чужеродной молекулой. Их называют факторами неспецифической защиты, т.к. они защищают организм от разных экзогенных и эндогенных агрессий и их защитные функции лишены избирательности. Среди этих факторов неспецифической защиты особое место занимают фагоцитирующие клетки крови и тканей, а также особый класс лимфоцитов, получивших название: натуральные (естественные) киллеры. Неспецифическую защиту организма обеспечивают также многочисленные молекулы, продуцируемые и секретируемые вышеназванными клетками, лимфоцитами, клетками печени. Среди защитных молекул, циркулирующих в крови, наиболее подробно изучена система комплемента, а за последние годы описаны многочисленные цитокины: интерлейкины, интерфероны и др. Наряду с этим внутренняя среда организма защищена от проникающих в нее чужеродных макромолекул, в том числе от патогенных микробов, механизмами специфического иммунного ответа. Эти механизмы приобретаются организмом после контакта с конкретным чужеродным веществом, носящим название антиген. Действие этих механизмов строго избирательно и распространяется только на конкретный антиген, который индуцировал иммунный ответ. Реализация иммунного ответа является функцией высоко специализированной иммунной системы организма. Основные защитные функции иммунной системы – распознавание и элиминацию чужеродных макромолекул – осуществляют иммунокомпетентные клетки (лимфоциты), а также продуцируемые и секретируемые ими макромолекулы – антитела (иммуноглобулины).

Местом функциональной кооперации всех 4 перечисленных клеток и макромолекул служат органы и ткани иммунной системы орга-

низма. Структура и функции органов иммунной системы различают первичные – центральные (костный мозг и тимус) и вторичные – периферические (селезенка, лимфатические узлы, скопления лимфоидной ткани) органы иммунной системы.

Периферические органы иммунной системы – лимфатические узлы, селезенка и лимфоидная ткань, ассоциированная со слизистыми – являются местом встречи антигенов с иммунокомпетентными клетками, местом распознавания антигена и развития специфического иммунного ответа, местом взаимодействия иммунокомпетентных клеток, их пролиферации (клональной экспансии), антиген-зависимой дифференцировки и местом накопления продуктов иммунного ответа.

Скопления лимфоцитов, макрофагов и других вспомогательных клеток обнаружены в составе многих органов и тканей, особенно в составе слизистых оболочек. Непосредственно под мукозным эпителием в тесной связи с эпителиальными клетками располагаются лимфоциты Пейеровых бляшек тонкого кишечника, лимфоидных фолликулов аппендикса, миндалин глотки, лимфоидных фолликулов подслизистого слоя верхних дыхательных путей и бронхов, мочеполового тракта. Все эти лимфоидные скопления получили собирательное название – ассоциированная со слизистыми лимфоидная ткань (MALT от mucosal-associated lymphoid tissue).

Лимфоциты – это единственные клетки организма, способные специфически распознавать и различать разные антигены и отвечать активацией на контакт с определенным антигеном. При весьма сходной морфологии малые лимфоциты делятся на две популяции: Т- и В-лимфоциты.

Одна из популяций получила название В-лимфоциты, от названия органа «бурса Фабрициуса», где было впервые обнаружено созревание этих клеток у птиц. В-лимфоциты распознают антигены специфическими рецепторами иммуноглобулиновой природы, которые по мере созревания экспрессируются на их мембранах. Взаимодействие антигена с такими рецепторами является сигналом активации В-лимфоцитов, и их антигензависимой дифференцировки в плазматические клетки, активно продуцирующие и секретирующие специфические для данного антигена антитела-иммуноглобулины.

Другая популяция получила название Т-лимфоциты в связи с их дифференцировкой в тимусе. По функциям среди Т-лимфоцитов различают эффекторные (CD8⁺ цитотоксические-CTL) и регуляторные (CD4⁺ Т хелперы-ТН) субпопуляции. Особенность Т-клеточного рецептора – способность распознавать чужеродный антиген только в комплексе с собственными клеточными антигенами на поверхности вспомогательных антиген-представляющих клеток (дендритных или макрофагов). В отличие от В-лимфоцитов, способных распознавать антигены в растворе и связывать белковые, полисахаридные и липопротеидные растворимые антигены, Т-лимфоциты могут распознать только короткие пептидные фрагменты белковых антигенов, представленные на мембране других клеток в комплексе с собственными антигенами главного комплекса гистосовместимости. CD4⁺ Т-лимфоциты способны распознавать антигенные пептиды в комплексе с антигенами гистосовместимости МНС II класса, а CD8⁺ Т-лимфоциты способны распознавать антигенные пептиды в комплексе с антигенами гистосовместимости МНС I класса. Взаимодействие антигена с антиген-распознающим рецептором является сигналом активации Т-лимфоцитов, которая проявляется продукцией и секрецией цитокинов, усиливающих процессы пролиферации и дифференцировки самих Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и макрофагов. Кроме того, цитокины способствуют выходу из кровяного русла и активации лейкоцитов, участвующих в воспалительных реакциях. Активация цитотоксических Т-лимфоцитов проявляется лизисом клеток мишеней, несущих на мембране соответствующий чужеродный антиген, который распознается также только в комплексе с собственными антигенами гистосовместимости.

Вторую крупную популяцию клеток иммунной системы составляет система мононуклеарных фагоцитов, которая включает происходящие из единой стволовой клетки костномозговые предшественники – монобласт и промоноцит, циркулирующий в крови моноцит и зрелые тканевые макрофаги. Мононуклеарные фагоциты обеспечивают в значительной степени неспецифическую защиту организма за счет своей фагоцитарной функции. Секретируемые макрофагами молекулы выполняют эффекторные и регуляторные функции. При формировании специфического иммунного ответа макрофаги выполняют функцию

представления (презентации) антигена. Для этого захваченный макрофагами антиген подвергается переработке в фаголизосомах. Образующиеся в результате ограниченного протеолиза пептидные фрагменты антигена комплексируются с молекулами антигенов главного комплекса гистосовместимости класса 2 и выставляются на мембране макрофага в форме, доступной для распознавания Т-лимфоцитами. Кроме того, секретлируемые макрофагами цитокины, в частности интерлейкин-1, способствуют активации Т-лимфоцитов при их ответе на антиген.

В эффекторной фазе специфического иммунного ответа могут участвовать и другие лейкоциты крови: гранулоциты или полиморфноядерные лейкоциты. Эти клетки составляют первую линию неспецифической противомикробной защиты. Они первыми мобилизуются в очаг воспаления или инфекции и от их фагоцитарной активности зависит элиминация возбудителей. Их мобилизация из кровяного русла резко повышается под влиянием цитокинов макрофагального происхождения (интерлейкин-8) или C5a -фракции активированной системы комплемента. Другие продукты макрофагов активируют функции гранулоцитов (туморнекротизирующий фактор- α).

Цитокины являются продуктами иммунокомпетентных клеток и в то же время иммунокомпетентные клетки служат мишенями действия цитокинов. По основным механизмам действия цитокины можно разделить на: ростовые факторы, контролирующие продукцию иммунокомпетентных клеток, провоспалительные цитокины, обеспечивающие мобилизацию и активацию клеток – участников воспаления, противовоспалительные цитокины с альтернативным характером действия, ограничивающие развитие воспаления, цитокины, регулирующие клеточный и гуморальный иммунный ответ, цитокины, обладающие собственными эффекторными функциями (противовирусным, цитотоксическим). Однако этим перечислением не исчерпывается все многообразие эффектов цитокинов, которые контролируют и процессы ангиогенеза, и процессы регенерации, и метаболические процессы и т.д.⁵

⁵ Фрейдлин И.С. Иммунная система и ее дефекты: Руководство для врачей. СПб., 1998. – 113 с. – ISBN 5-230-08852-4.

РАЗДЕЛ 2. МОРФОЛОГИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ ЗРЕЛОГО НЕЙТРОФИЛЬНОГО ГРАНУЛОЦИТА

Гранулоциты периферической крови человека в подавляющем большинстве представлены нейтрофилами. Зрелые неспособные к делению нейтрофильные гранулоциты имеют в мазках диаметр 9-15 μm , около 65% объема их клетки занимает цитоплазма, 20% – ядро, 15% – гранулы трех видов (азурофильные, специфические, желатиновые). В характерном сегментированном ядре обнаруживается большое количество гетерохроматина, который плотным ободком прижимает к ядерной мембране и прерывается только в области ядерных пор. Ядрышки встречаются редко или отсутствуют, что указывает на подавление синтеза белка. Ядро зрелого нейтрофила имеет 2-4 сегмента, крупнозернистый хроматин. Ранее считалось, что такая структура хроматина – свидетельство транскрипционной неактивности ядра. Позднее установили, что в зрелых нейтрофильных гранулоцитах действительно проходит активная транскрипция, доказано, что нейтрофилы способны к биосинтезу иммуномедиаторов (цитокинов).

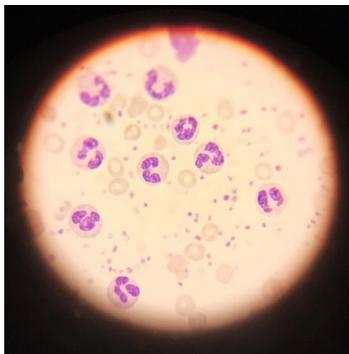


Рис. 1. Нейтрофилы в лейкоконцентрате на LE-клетки периферической крови человека [мазок на стекле, окраска по Романовскому, световой микроскоп, увеличение $\times 1000$. Автор фото: Долгобородова Е. А., врач КЛД Первой ГКБ им. Е.Е. Волосевич, Архангельск]

Морфологическая структура нейтрофилов меняется и имеет свои особенности. При аллергических заболеваниях обращает на себя внимание наличие двух типов клеток, различающихся по плотности цитоплазматического матрикса. Первые – «светлые» со сниженной электронной плотностью, содержащие мало гранул, вакуоли и фагосомы. Вторые – «темные», с цитоплазмой умеренной плотности. Ультраструктурные изменения по ряду признаков характерны и для хронической инфекции: уменьшается количество специфических гранул, что ассоциируется со снижением бактерицидной активности нейтрофилов. В крови онкологических пациентов преобладают большие «светлые» нейтрофилы, в которых резко снижено число специфических и азурофильных гранул, много вакуолей и фагосом. Эти изменения носят обратимый характер и частично исчезают при успешном лечении⁶.

В цитоплазме зрелого нейтрофильного фагоцита имеются также особые структуры – секреторные пузырьки, возникающие путем эндцитоза во время поздних стадий дифференцировки нейтрофилов. В секреторных пузырьках находится альбумин, а в мембрану встроены рецепторы компонентов комплемента CR1 и CR3, CD45, компонент НАДФН оксидазного комплекса Cytb. Сливаясь с цитоплазматической мембраной, эти пузырьки могут быстро увеличивать количество рецепторов на поверхности нейтрофильных гранулоцитов или количество Cytb в мембране фагосомы. В зрелом состоянии нейтрофильные фагоциты содержат очень мало митохондрий и энергию черпают из процессов анаэробного гликолиза, что позволяет им существовать в воспаленных тканях, где концентрация кислорода очень низкая.

В последние годы в цитоплазме клеток врожденного иммунитета, в том числе в нейтрофильных гранулоцитах, открыты новые протеиновые комплексы макромолекул – инфламасомы, в образовании которых принимают участие различные Nod-подобные рецепторы (NLRs).

Инфламасомы представляют собой цитозольные полипротеиновые комплексы. Они образуются в ответ на внешние и внутренние стимулы, включая вирусные и бактериальные инфекции. Инфламасо-

⁶ Клетки иммунной системы: учеб. пособие / А.А.Тотолян, И.С. Фрейдлин; Санкт-Петербург: Наука, 2000. Т. 1 : Нейтрофилы. – 130 с.

мы играют важную роль в запуске каскада воспаления с образованием цитокинов: IL-1 β и IL-18. Опосредованная NOD-рецепторами активация инфламмасом по каноническому сигнальному пути приводит к появлению в цитозоле активной формы каспазы-1 – протеазы, которая формирует активные формы цитокинов IL-1 β и IL-18 из их предшественников про-IL-1 β и про-IL-18, ферментативно отщепляя часть протеина. Помимо этого, переводится в активную форму порообразующий протеин газдермин D, образующий поры в мембранах клетки нейтрофильного гранулоцита (см. рис.2).

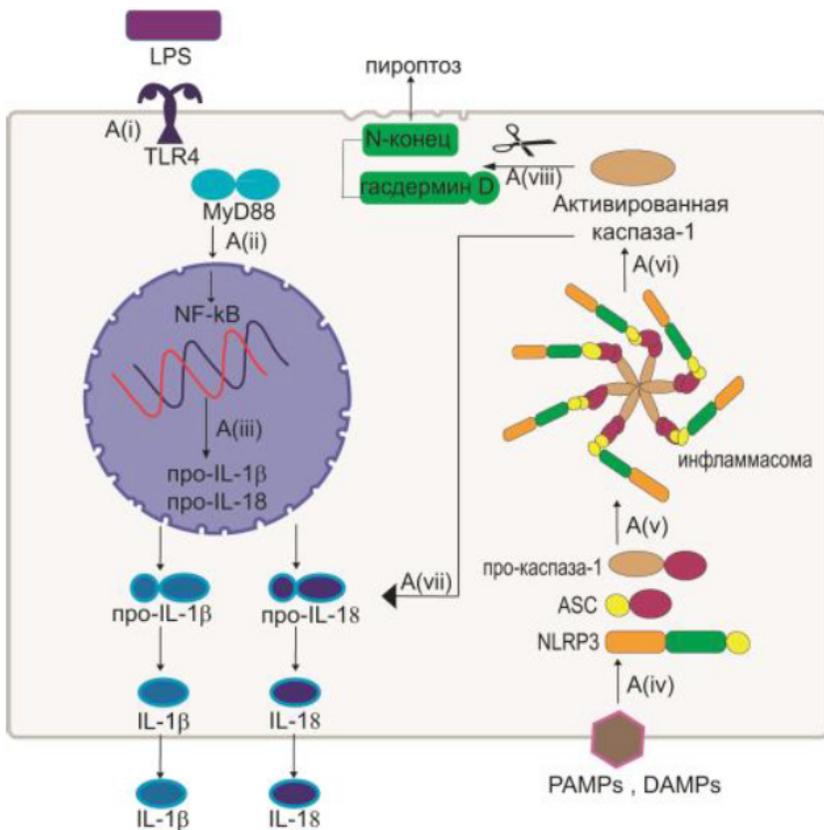


Рис. 2. Каноническая активация инфламмасом (канонический сигнальный путь)

(i) Липопо-лисахарид (LPS) распознается TLR4, (ii) активируя сигнальный путь NF-κB, (iii) вследствие чего увеличивается уровень транскрипции неактивных предшественников про-IL-1β, про-IL-18, и прокаспазы-11 (iv). Вторичный воспалительный сигнал (к примеру, PAMP или DAMP) запускает формирование инфламмосомы (vi). Происходит гидролиз и активация прокаспазы-1, про-IL-1β, и про-IL-18, (vii) с дальнейшей секрецией IL-1β и IL-18 из клетки⁷.

На поверхностной мембране клетки нейтрофильного гранулоцита, на мембранах эндосом и внутри цитоплазмы находятся специальные рецепторы против компонентов патогенов – паттерн-ассоциированные рецепторы (PRRs), распознающих патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMPs). К таким рецепторам относят широкую группу Toll-подобных рецепторов (TLR), лектиновые рецепторы С типа (CLR), цитоплазматические рецепторы РНК (RLR, RIG-I-подобные рецепторы), Nod-подобные рецепторы (NLRs)^{8, 9}.

Основной физиологической функцией нейтрофильных гранулоцитов является борьба с микроорганизмами путем фагоцитоза. Начало учению о фагоцитозе было положено И.И. Мечниковым в 1892 г. Современные представления о фагоцитозе базируются на огромном накопленном материале. Фагоцитоз – многостадийный процесс и состоит из следующих этапов: активация, хемотаксис, адгезия, миграция, поглощение, дегрануляция, образование активных форм кислорода, киллинг, расщепление объектов фагоцитоза.

Хемотаксис – способность клетки активно перемещаться в направлении стимулирующих агентов, которые называются хемоаттрактантами или хемокинами. В результате повреждения тканей происходит локальный протеолиз белков, образуются пептиды, которые являются хемоаттрактантами для нейтрофилов. Бактерии, микрочастицы, ток-

⁷ Гаранина Е. Е., Мартынова Е. В., Иванов К. Я. и соавт. «Инфламмосомы: роль в патогенезе заболеваний и терапевтический потенциал» Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки, vol. 162, no. 1, 2020, pp. 80–111.

⁸ Carty M, Guy C, Bowie AG. Detection of Viral Infections by Innate Immunity. *Biochem Pharmacol.* 2021 Jan;183:114316. doi: 10.1016/j.bcp.2020.114316. Epub 2020 Nov 3. PMID: 33152343.

⁹ Гаранина Е.Е., Мартынова Е.В., Иванов К.Я. и соавт. «Инфламмосомы: роль в патогенезе заболеваний и терапевтический потенциал» Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки, vol. 162, no. 1, 2020, pp. 80–111.

сины индуцируют продукцию провоспалительных цитокинов (IL-8, IL-1, TNF, GM-CSF, G-CSF, PAF) клетками кожи, слизистых оболочек, подлежащей соединительной ткани. Активированными тканевыми макрофагами, фибробластами, кератиноцитами и другими клетками соединительной ткани синтезируется интерлейкин-8 (IL-8) – главный хемоаттрактант и активатор нейтрофилов, накапливающийся локально в очаге с формированием градиента концентрации. Хемокины могут продуцировать и клетки эндотелия кровеносных сосудов. К хемоаттрактантам относятся также компонент комплемента C5a и лейкотриен LTB4. Хемоаттрактанты воздействуют на эндотелиоциты, выстилающие капилляры, усиливая экспрессию адгезионных молекул, влияющих на секвестрацию нейтрофилов в определенных участках микроциркуляторного русла.

Считается, что циркулирующие нейтрофилы крови имеют сферическую форму. Однако при активировании под влиянием химических стимулов или прикрепления к поверхностям морфология нейтрофилов меняется. В начале направленной миграции происходит поляризация клетки с образованием переднего и заднего полюсов, нейтрофилы приобретают классическую амебоидную форму с растущими псевдоподиями. Нейтрофилы становятся праймированными к выполнению своей функциональной активности. Праймирование включает слияние цитоплазматических гранул нейтрофилов с мембраной, в результате чего увеличивается число рецепторов на клеточной поверхности. Активация ассоциирована с секрецией нейтрофилами многих медиаторов воспаления, таких как эйкозаноиды, свободные радикалы, протеолитические ферменты.

Адгезия нейтрофилов к эндотелию предшествует выходу нейтрофилов из сосудистого русла в очаг воспаления. Перед тем, как выйти из циркуляции в ткани нейтрофилы прикрепляются к капиллярной стенке. В легких 2/3 нейтрофилов, находящихся в сосудистом русле, прилипают к эндотелию, образуя пристеночный пул нейтрофилов. Выделяют 5 стадий адгезионного каскада нейтрофилов: «захватывание», роллинг, медленный роллинг, прочная адгезия и трансмиграция. Каждая из этих стадий необходима для привлечения нейтрофилов. Этот процесс регулируется тремя группами адгезионных молекул – селектины, интегрины, молекулы суперсемейства иммуноглобулинов

ICAM. Селектины – адгезионные трансмембранные молекулы, имеющие сходное молекулярное строение и узнающие муциноподобные сialiрированные гликопротеины. Эндотелиальные клетки экспрессируют Р- и Е-селектины, а нейтрофильные гранулоциты постоянно экспрессируют L-селектины (CD62L). Привлечение нейтрофилов в очаг воспаления регулируется временными взаимодействиями между тремя типами селектинов, замедляется скорость движения нейтрофила, и он начинает «качение» или роллинг. Процесс роллинга позволяет нейтрофилам стать активированными хемокинами и другими медиаторами, которые продуцирует эндотелий, что способствует прочной адгезии с помощью β 2-интегринов. Интегрины – адгезионные молекулы, гетеродимеры, состоящие из α - и β -цепи. В зависимости от разных типов α - и β -цепи различают разные типы интегринов. Основным интегрином нейтрофилов является CD11b/CD18 (Mac-1). Лигандами интегринов являются другие адгезионные молекулы (ICAM, VCAM) и компоненты матрикса соединительных тканей (фибронектин, ламинин, витронектин, коллаген).

Миграция нейтрофилов в сайт воспаления включает межклеточные адгезионные взаимодействия через α 4-интегрины и молекулы суперсемейства иммуноглобулинов PECAM-1, связывающих компоненты внеклеточного матрикса. Активация нейтрофилов индуцирует высвобождение желатиназы В (MMP-9, участвующей в деградации молекул внеклеточного матрикса).

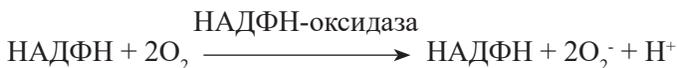
Поглощение и дегрануляция. Нейтрофилы прежде всего – фагоциты, поглощенные ими бактерии оказавшись в фагосоме, подвергаются действию целого арсенала цитотоксических веществ. Сначала фагоцит приходит в тесный контакт с мишенью, и плазматическая мембрана нейтрофила полностью окружает ее, формируется внутренний компартмент, содержащий минимум внеклеточной жидкости, и фагосома оказывается очень небольшой по размеру. Поглощение микроорганизмов нейтрофильными гранулоцитами происходит более эффективно при наличии в среде опсонинoв – IgG, компонентов комплемента, фибронектина, белков острой фазы и др., которые связываются с объектами фагоцитоза и для которых на мембране фагоцитов имеются рецепторы. К рецепторам, опосредующим адгезию фагоцита к патогену относятся: Fc-рецепторы – для Fc-участков иммуноглобу-

линов, рецепторы к компонентам комплемента – CR1, рецептор к липополисахаридам – связывающему белку острой фазы – CD14 и др. В фагосому вливаются сначала специфические гранулы с лизоцимом, лактоферрином. Лактоферрин связывает железо и таким образом обеспечивает бактериостатический эффект, так как большинство бактерий не размножаются в отсутствие железа. Лизоцим и лактоферрин действуют синергично – лактоферрин повреждает клеточную стенку бактерий, что делает ее более доступной для действия лизоцима. Затем в фагосому поступает содержимое азурофильных гранул: протеиназы, фосфолипазы, гликозилазы, дефенсины, катепсин G и другие белки и пептиды, которые нарушают функцию или структуру микроорганизмов. В азурофильных гранулах также содержится один из важнейших компонентов, необходимых для эффекторной функции нейтрофильных гранулоцитов – миелопероксидаза, антибактериальный белок, участвующий в образовании активных форм кислорода во время киллинга и расщепления содержимого фагосом.

Киллинг микроорганизмов внутри фагосомы может происходить путем кислород-независимых и кислород-зависимых механизмов. Циркулирующие нейтрофилы содержат мало митохондрий и в фазе покоя потребляют мало кислорода. Кислород-зависимый механизм не является системой жизнеобеспечения нейтрофильного лейкоцита, который отлично переносит гипоксию и нормально выполняет ряд функций в условиях анаэробнобиоза. При помощи респираторного взрыва нейтрофил решает эффекторные задачи, направленные на уничтожение микроорганизмов

Кислород-зависимый механизм включает окисление кислорода НАДФН-оксидазной системой с образованием активных форм кислорода. Изменения цитоплазматической мембраны, инициированные активирующими агентами – бактериями, хемотаксическими факторами, липополисахаридами стенок микроорганизмов, форболмири-стат-ацетатом (РМА), конкавалин А, шарики полистирола, вызывают «врыв» метаболической активности нейтрофила, радикально меняет его метаболический профиль. К наиболее ярким сдвигам относится резкое увеличение расхода глюкозы в реакциях гексозомонофосфатного шунта (ГМФС). Если в покоящемся нейтрофильном лейкоците подобным образом утилизируется лишь 1-2% глюкозы, то стимулиро-

ванный нейтрофильный гранулоцит способен окислить до 30% глюкозы. Одновременно возрастают потребление кислорода и образование оксидантов с мощным энергетическим потенциалом. Активные формы кислорода (АФК) – это высокореакционные, преимущественно радикальные, кислородные соединения, образующиеся в живых организмах в результате неполного восстановления молекулярного кислорода или спина одного из его электронов, находящихся на внешних орбиталях. К первичным кислородным метаболитам активированного кислорода относят супероксидный анион-радикал (O_2^-), перекись водорода (H_2O_2), гидроксильный радикал (ОН·), синглетный кислород (1O_2). Вторичными метаболитами являются: гипохлорная кислота (НОСЛ), хлорамины, продукты перекисного окисления липидов. Эти АФК играют важную роль в защитных, неспецифических иммунных механизмах организма: они выделяются в ходе активации нейтрофилов, макрофагов при инфекционных и иных воспалительных процессах¹⁰. При метаболическом взрыве в клетке увеличивается концентрация НАДФН, который подвергается окислению:



Образование O_2^- – это первый этап в серии реакций, которые сопровождаются образованием токсических продуктов O_2^- . Перекись водорода (H_2O_2) обладает цитотоксическим действием, индуцирует апоптотическую гибель опухолевых клеток, эндотелиоцитов, Т-лимфоцитов. Генерация АФК, и в том числе (H_2O_2), при взаимодействии активированных нейтрофилов крови с эндотелиоцитами служит одной из основных причин повреждения эндотелия и подлежащих тканей при остром воспалении. H_2O_2 является источником возникновения высокореакционного гидроксильного радикала, а в присутствии миелопероксидазы – гипогалогенновых кислот (НОСЛ,

¹⁰ Солодовникова О.Н., Молочный В.П. «Кислородный взрыв» нейтрофильных лейкоцитов в патогенезе воспалительной реакции при гнойных инфекциях у детей // Дальневосточный медицинский журнал. 2012. №1. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/kislorodnyy-vzryv-neytrofilnyh-leykotsitov-v-patogeneze-vospalitelnoy-reaktsii-pri-gnoynyh-infektsiyah-u-detej> (дата обращения: 27.11.2022).

НОВr, NOI, HOSCN), которые также цитотоксичны и важны для микробицидного действия нейтрофильных лейкоцитов.

Активные формы кислорода и ионы галогенов суммарно вызывают окисление мембранных липидов микроорганизмов, инактивацию их ферментов, подавление синтеза нуклеиновых кислот. При мутациях и делециях к генам, кодирующим НАДФН-оксидазную систему, не образуются активные формы кислорода в фагоцитирующих клетках, дефекты проявляются в виде различных форм хронического гранулематоза.

Кислород-независимые механизмы киллинга вызывают гибель микроорганизмов внутри фагосомы в результате влияния кислой реакции среды, гидролитических ферментов, микробицидных белков и пептидов. Кислород-независимый киллинг обеспечивается катионными белками, которые подразделяются на ферментные и неферментные. Ферментные катионные белки – лизоцим, катепсин G, эластаза, разрушают стенку микроба за счет протеиназного эффекта. Неферментные катионные белки – дефенсины, бактерицидный проницаемость-увеличивающий белок В/PI, лактоферрин, вызывают гибель микроорганизмов путем электростатического взаимодействия с их поверхностью.

РАЗДЕЛ 3. НЕЙТРОФИЛЬНЫЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ЛОВУШКИ

Нейтрофильные внеклеточные ловушки (NETs) — это сетеподобные структуры, состоящие из ДНК-гистоновых комплексов и белков, выбрасываемых активированными нейтрофилами. Кроме ключевой роли нейтрофилов как клеток неспецифической иммунной защиты, нейтрофильные ловушки могут играть роль в аутоиммунных заболеваниях, таких как системная красная волчанка, ревматоидный артрит и псориаз, а также при других патофизиологических состояниях неинфекционной природы – нарушении гемостаза, атеросклероз, диабет, васкулиты и рак, и даже заживление ран и периодонтиты¹¹.



Рис. 3. Фотография нейтрофильных ловушек, открытых Фолькманом Бринкманном и Артуро Зыхлинским. Изображение со сканирующего электронного микроскопа. Ловушки показаны зеленым цветом, нейтрофил – желтым, бактерии – лиловым, эритроцит – оранжевым. [Источник: Википедия]

Впервые ловушки были открыты Фолькером Бринкманом и Артуро Зыхлинским в 2004. Группа Зыхлинского продемонстрировала, как ловушки убивают бактерии, открыв новую форму антимикробной

¹¹ Masucci MT, Minopoli M, Del Vecchio S and Carriero MV (2020) The Emerging Role of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Tumor Progression and Metastasis. *Front. Immunol.* 11:1749. doi:10.3389/fimmu.2020.01749

неспецифической защиты. В первой публикации о ловушках в статье в журнале Science в 2004 году авторы написали: «Нейтрофилы поглощают и убивают бактерии, когда их антимикробные гранулы сливаются с фагосомой. Мы же описываем, что при активации нейтрофилы выбрасывают содержимое гранул и хроматин, которые превращаются во внеклеточные нити, связывающие Грам-положительные и Грам-отрицательные бактерии»¹².

Нетоз – это процесс, при котором нейтрофилы выбрасывают ловушки, где центральными событиями являются разворачивание нуклеосомы и цитруллинирование гистонов. Нетоз считается одним из типов гибели клетки, в дополнение к известным апоптозу и некрозу, при котором из активированных нейтрофилов во внеклеточное пространство выбрасываются деконденсированный хроматин и содержимое гранул. Запуск процесса деконденсации хроматина может идти двумя путями: за счет активации PAD-4 (протеин-аргининовая деиминаза 4 типа), который также катализирует цитруллинирование гистонов с образованием citH3, и за счет активных форм кислорода, лизирующих мембрану ядер. Нити ДНК вне нейтрофила образуют комплексы с гистонами – ловушки, и удерживают патогенов или способствуют их фагоцитозу другими клетками.

Нейтрофильные экстраклеточные ловушки рассматриваются как форма реагирования предварительно активированных нейтрофилов на контактные взаимодействия с клетками, находящимися в состоянии апоптоза¹³. Нейтрофилы периферической крови предварительно активируются, получая сигналы активации через различные рецепторы врожденного иммунитета. В ходе активации нейтрофилов происходит экспрессия генома, развивается синтез цитокинов, ферментов, осуществляется генерация активных форм кислорода. Однако этого недостаточно для формирования нейтрофильных экстраклеточных

¹² Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science. 2004 Mar 5;303(5663):1532-5. doi: 10.1126/science.1092385. PMID: 15001782.

¹³ Александр Николаевич Казимирский, Ж. М. Салмаси, Г. В. Порядин. Антивирусная система врожденного иммунитета: патогенез и лечение COVID-19 // Вестник РГМУ. 2020. №5. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/antivirusnaya-sistema-vrozhdennogo-immuniteta-patogenez-i-lechenie-covid-19>

ловушек. Раскрытие нейтрофильных экстраклеточных ловушек происходит после контактных взаимодействий с апоптозирующими клетками или их остатками. Сеть из волокон нейтрофильной ДНК захватывает и удерживает апоптозирующиеся клетки, а затем другие интактные нейтрофилы и моноциты фагоцитируют эту структуру, гидролизуют ее компоненты и презентуют антигены. Сигнальная молекула, заставляющая активированные нейтрофилы формировать нейтрофильные экстраклеточные ловушки, – мембранный липид фосфатидилсерин, локализованный на поверхности апоптозирующихся клеток. Развитие апоптоза клетки сопряжено с инверсией фосфатидилсерина, в норме расположенного на внутренней поверхности клеточной мембраны (рис. 4 и 5).

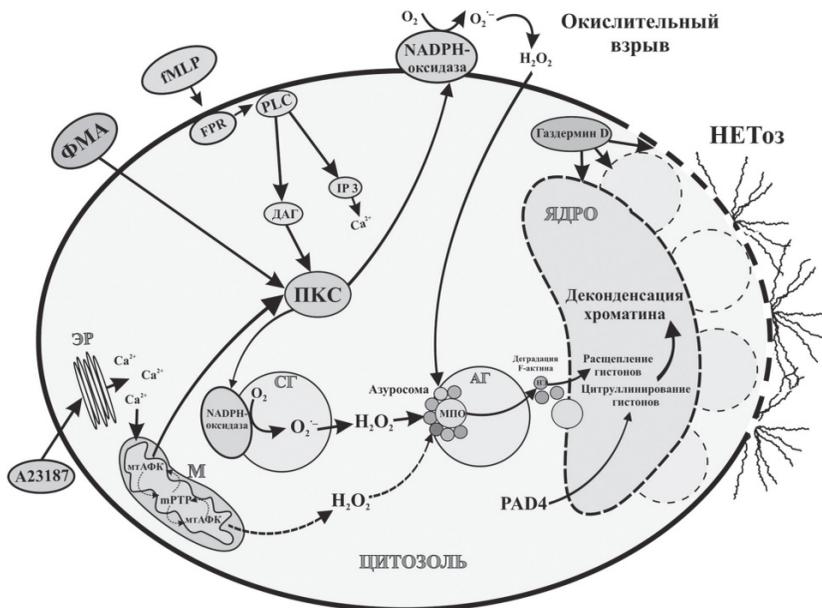


Рис. 4. Схематическое изображение классического НЕТоза

Классический суицидальный нетоз сопряжен с клеточной гибелью, процесс занимает 3-4 часа, запускается активацией NADPH-оксидазы.

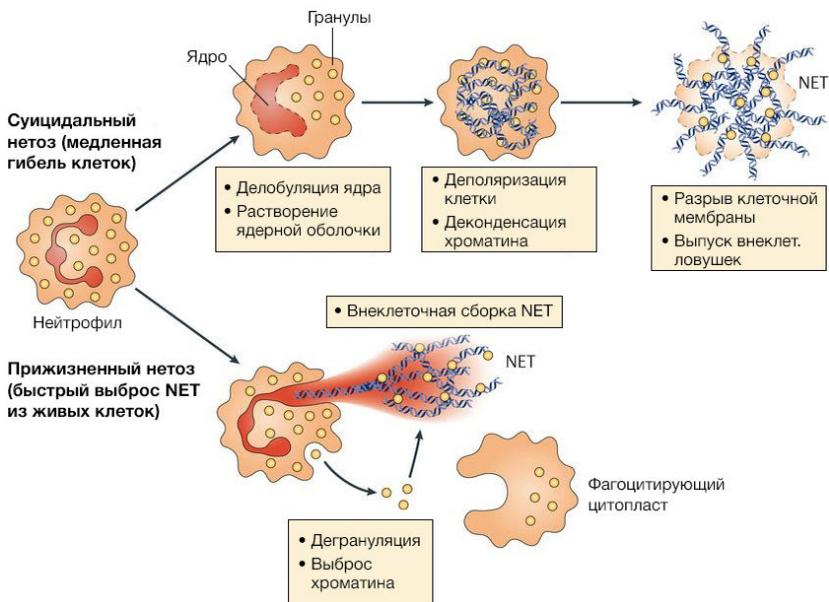


Рис. 5. Классические суицидальный и прижизненный НЕТОз
 [Источник: Nature Reviews Immunology]

Стимулятор классического НЕТОза форбол 12-мирикат 13-ацетат (ФМА) активирует изоформы протеинкиназы С (ПКС), участвующие в фосфорилировании субъединиц NADPH-оксидазы. Последующая сборка и активация NADPH-оксидазы на мембранах специфических гранул (СГ) и на цитоплазматической мембране приводят к превращению молекулярного кислорода в супероксидный анион-радикал (O_2^-). Затем супероксид дисмутирует спонтанно или при участии супероксиддисмутазы с образованием пероксида водорода (H_2O_2). NADPH-оксидаза может быть также активирована хемоаттрактантом N-формилметионил-лейцил-фенилаланином (fMLP), который, связываясь со специфическим рецептором, активирует фосфолипазу С (PLC), стимулирующую образование диацилглицерола (ДАГ) и инозитолтрифосфата (IP3) из фосфатидилинозитолдифосфата. По невыясненным до сих пор причинам, fMLP не индуцирует НЕТОз. Пероксид водорода стимулирует диссоциацию «азуросом», расположенных в мембранах азурофильных гранул (АГ) и состоящих из 8 типов белков, включая миелопероксидазу

(МПО) и сериновые протеазы – нейтрофильную эластазу (НЭ), катепсин G и азуроцидин. Сериновые протеазы выходят в цитозоль и расщепляют F-актин, способствуя диссоциации актинового цитоскелета и иммобилизации нейтрофила. Затем сериновые протеазы мигрируют из цитозоля в ядро, где они (в основном, НЭ) расщепляют гистоны, способствуя деконденсации хроматина. МПО также перемещается в ядро, где действует синергетически с НЭ. Из цитоплазмы в ядро также поступает пептидил-аргининдезаминаза 4 (PAD4), которая обеспечивает цитруллинирование гистонов, что приводит к ослаблению связи гистонов с хроматином и его последующей деконденсации. Параллельно происходит везикуляция ядерной мембраны и разрушение мембран гранул при участии порообразующего белка газдермина D, что приводит к последующему электростатическому связыванию содержимого гранул с деконденсированным хроматином. На завершающей стадии процесса в цитоплазматической мембране образуются поры, также сформированные газдермином D, через которые хроматин выбрасывается во внеклеточное пространство – происходит НЕТоз. НЕТоз, вызванный кальциевым ионофором A23187, начинается с мобилизации Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума (ЭР). Последующее накопление Ca^{2+} в митохондриальном матриксе (М) приводит к активации неселективной митохондриальной поры (mPTP) и образованию митохондриальных активных форм кислорода (мТАФК). мТАФК затем выходят из митохондрий в цитозоль, где активируют NADPH-оксидазу, по-видимому, при участии протеинкиназы C (ПКК). Пунктирные стрелки указывают на гипотетический путь передачи информации (рис. 4)¹⁴.

Центральным событием запуска нетоза является деконденсация хроматина за счет разворачивания нуклеосом. В этом процессе ключевую роль играет фермент пептидиларгининдезаминаза 4 (PAD4), поступающая в ядро из цитоплазмы. PAD4 обеспечивает цитруллинирование гистонов – дезаминирование положительно заряженных остатков аргининов с образованием электронейтральных цитруллинов (рис.5), что приводит к ослаблению связи гистонов с хроматином и его последующей деконденсации. Мыши *Padi4^{-/-}* с дефектом PAD4 были значительно-

¹⁴ Воробьева Н. В. (2020). НЕЙТРОФИЛЬНЫЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ЛОВУШКИ: НОВЫЕ АСПЕКТЫ. Вестник Московского университета. Серия 16. Биология, 75 (4), 210-225.

но защищены от множества аутоиммунных признаков, характерных для системной красной волчанки, включая выработку аутоантител, IFN типа I, отложение иммунных комплексов в почках и эндотелиальную дисфункцию. Недостаток PAD4 все еще позволял некоторым нейтрофилам образовывать ловушки. Однако у ловушек, сформированных в отсутствие PAD4, было значительно меньше Cit-H3 и, они были менее эффективны в индуцировании эндотелиальной дисфункции и реакций IFN типа I, чем ловушки, сформированные в присутствии PAD4¹⁵.

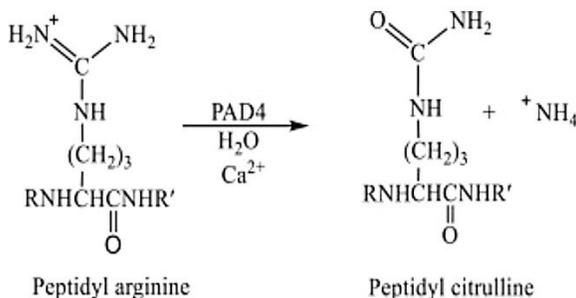


Рис. 6. Цитрулинирование гистонов с помощью PAD4¹⁶

Витальный или «быстрый» нетоз занимает от 5 до 60 минут и происходит без гибели клетки и не зависит от НАДФН-оксидазы.

Прижизненный выброс внеклеточного хроматина запускается активацией поверхностных рецепторов на нейтрофильном гранулоците. Это может быть вызвано опосредованной TLR-4 активацией тромбоцитов и их взаимодействием с CD11a на нейтрофилах. Кроме того, активация через рецептор комплемента 3 (CR3) и TLR-2 также была показана в присутствии грамположительных бактерий для, например, *Staphylococcus aureus*. При этом наружная мембрана остается интактной, а клетки со-

¹⁵ Liu Y, Lightfoot YL, Seto N, Carmona-Rivera C, Moore E, Goel R, O'Neil L, Mistry P, Hoffmann V, Mondal S, Premnath PN, Gribbons K, Dell'Orso S, Jiang K, Thompson PR, Sun HW, Coonrod SA, Kaplan MJ. Peptidylarginine deiminases 2 and 4 modulate innate and adaptive immune responses in TLR-7-dependent lupus. *JCI Insight*. 2018 Dec 6;3(23):e124729. doi: 10.1172/jci.insight.124729. PMID: 30518690; PMCID: PMC6328098

¹⁶ Harry Morrison, in *Enzyme Active Sites and their Reaction Mechanisms*, 1st Edition, 2020; ISBN: 9780128210673

храняют свою жизнеспособность и естественные эффекторные функции, такие как миграция и фагоцитоз. Ядро округляется, хроматин деконденсируется, а ядерная ДНК поставляется наружу клетки внутри везикул, которые отпочковываются от ядра. Витальный нетоз может происходить с выбросом как ядерной, так и митохондриальной ДНК (рис. 6).

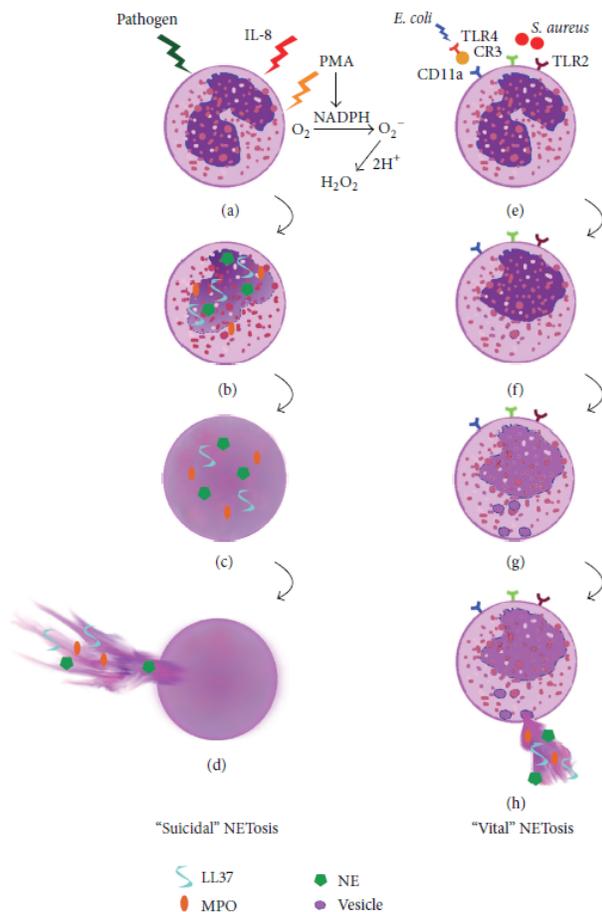


Рис. 7. Классический (слева) и витальный нетоз (справа)¹⁷

¹⁷ de Buhr N, von Köckritz-Blickwede M. How Neutrophil Extracellular Traps Become Visible. J Immunol Res. 2016;2016:4604713. doi: 10.1155/2016/4604713. Epub 2016 May 16. PMID: 27294157; PMCID: PMC4884809.

Нетоз, первоначально считавшийся защитным/апоптотическим механизмом, теперь рассматривается как способ защиты в экстремальных ситуациях, который в отдельных случаях оказывает сильные неблагоприятные эффекты на физиологию тканей, усугубляя патологию. Примером может служить опосредованное нейтрофильными ловушками повреждение органов у пациентов с COVID-19.

Хотя в 2004 авторы, открывшие нейтрофильные ловушки, предположили их роль во врожденном иммунитете против микроорганизмов, впоследствии появились данные об их более широких функциях: они играют роль при аутоиммунных заболеваниях, сепсисе, метаболических расстройствах, аутовоспалительных заболеваниях и даже могут выступать в качестве онкомаркера¹⁸. Немаловажное значение придают нейтрофильным ловушкам в патогенезе COVID-19^{19, 20}.

Нейтрофильные ловушки помимо участия в противомикробных защитных механизмах также могут выступать в качестве регуляторов воспалительного процесса, поскольку они могут действовать как ключевой компонент в инициации и разрешении воспаления. Рекрутирование нейтрофилов к области воспаления индуцирует высвобождение особой формы нейтрофильных ловушек, называемой агрегированными ловушками, которые регулируют воспаление путем связывания с провоспалительными цитокинами, такими как IL-1 β и IL-6, и их секвестрирования; затем цитокины подвергаются деградации сериновыми протеазами, прикрепленными к сетям. Про- или противовоспалительный эффект нетоза зависит от качества, количества и длины нейтрофильных ловушек, что подчеркивает новые, замысловатые и сложные механизмы, используемые нейтрофилами для выполнения своей роли в иммунной защите и воспалении.

Таким образом более развернуто нетоз можно определить, как механизм, который усиливает микробицидные свойства нейтрофилов

¹⁸ Mutua V, Gershwin LJ. A Review of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Disease: Potential Anti-NETs Therapeutics. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2021 Oct;61(2):194-211. doi: 10.1007/s12016-020-08804-7. PMID: 32740860; PMCID: PMC7395212.

¹⁹ Becker RC. COVID-19 update: Covid-19-associated coagulopathy. *J Thromb Thrombolysis.* 2020 Jul;50(1):54-67. doi: 10.1007/s11239-020-02134-3. PMID: 32415579; PMCID: PMC7225095.

²⁰ Colling ME, Kanthi Y. COVID-19-associated coagulopathy: An exploration of mechanisms. *Vasc Med.* 2020 Oct;25(5):471-478. doi: 10.1177/1358863X20932640. Epub 2020 Jun 19. PMID: 32558620; PMCID: PMC7306998.

и регулирует воспалительный ответ. Нейтрофилы поддерживают баланс между своим про- и противовоспалительной активностью, но в условиях, усиливающих формирование ловушек, они становятся патогенными²¹.

С открытием новых функций нейтрофилов, в частности нейтрофильных внеклеточных ловушек, произошла смена понимания роли нейтрофильных гранулоцитов в гомеостазе и в патогенезе заболеваний. Основным компонент гранул нейтрофилов, присутствующий в том числе на нитях ловушек – миелопероксидазу (МПО), больше не следует рассматривать исключительно как ферментный цитотоксический окислитель, поскольку в дополнение к повреждению тканей посредством ферментативных и неферментативных воздействий, МПО может также оказывать регулирующее действие на воспаление (рис. 7)²².

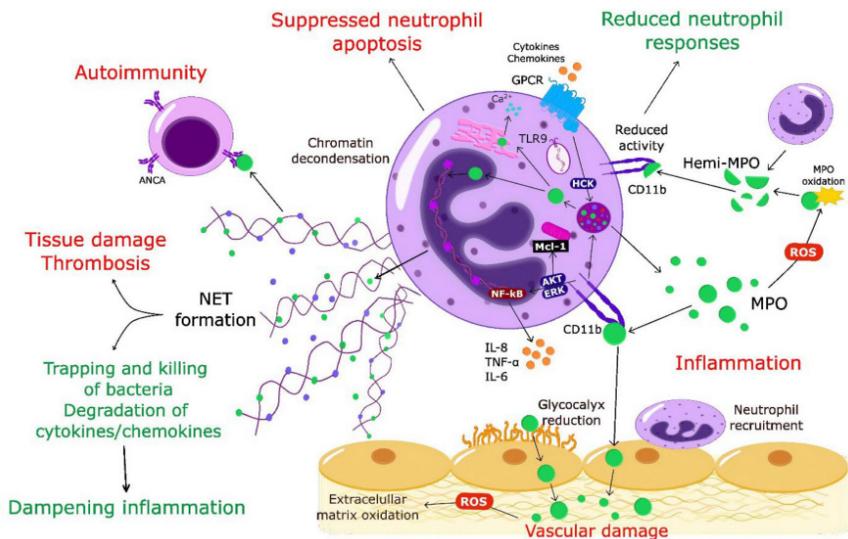


Рис. 8. Многогранное провоспалительное и защитное действие МПО

²¹ Sabbatini M, Magnelli V, Renò F. NETosis in Wound Healing: When Enough Is Enough. *Cells*. 2021 Feb 25;10(3):494. doi: 10.3390/cells10030494. PMID: 33668924; PMCID: PMC7996535.

²² Rizo-Téllez SA, Sekheri M, Filep JG. Myeloperoxidase: Regulation of Neutrophil Function and Target for Therapy. *Antioxidants (Basel)*. 2022 Nov 21;11(11):2302. doi: 10.3390/antiox11112302. PMID: 36421487; PMCID: PMC9687284.

Активация нейтрофилов через рецепторы хемокинов/цитокинов или TLR9 приводит к высвобождению МРО из первичных гранул. МРО катализирует локальное образование высокотоксичных окислителей, которые способствуют повреждению тканей. МРО облегчает таксис нейтрофилов в воспаленный участок, вызывает активацию нейтрофилов, дегрануляцию и генерирует сигналы выживания путем подавления конститутивного апоптоза нейтрофилов посредством неферментативных действий на CD11b. МРО-CD11b образуют механизм обратной связи для сохранения воспаления, опосредованного нейтрофилами. Диссоциация МРО на hemi-МРО приводит к снижению активности и притуплению реакций нейтрофилов. Внутриклеточно высвобождаемый МРО взаимодействует с эластазой нейтрофилов, вызывая деконденсацию хроматина, что приводит к выбросу внеклеточных ловушек нейтрофилов. Связанная с ловушками МРО способствует уничтожению бактерий и разрушает цитокины/хемокины, тем самым ослабляя воспаление. Напротив, ловушки были вовлечены в повреждение тканей и инициирование тромбоза. Избыточное образование ловушек (или нарушенная деградация NET) приводит к длительной презентации антигенов МРО, вызывая аутоиммунные реакции. Красный цвет указывает на провоспалительную активность МРО; зеленый цвет относится к защитным функциям. ANCA, антинейтрофильное цитоплазматическое антитело; GPCR, рецептор, связанный с G-белком; NET, внеклеточная ловушка нейтрофилов; ROS, активные формы кислорода; TLR9, toll-подобный рецептор 9.

РАЗДЕЛ 4. РОЛЬ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ЛОВУШЕК ПРИ ИНФЕКЦИЯХ

Большинство исследований о противомикробной роли нейтрофильных ловушек выполнено на мышах *invitro*, трудно сказать, как эта функция проявляется у человека *in vivo*. Тем не менее было показано, что нейтрофильные ловушки оказывают положительное влияние на контроль бактериальных инфекций. Они выполняют противобактериальную функцию за счет веществ, обладающих бактерицидным действием (гистоны, катепсин G, нейтрофильная эластаза, МПО, лактоферрин, антимикробный пептид-LL37, пентраксин 3, желатиназа, протеиназа 3 и пептидогликан-связывающие протеины). Нейтрофильные ловушки ограничивают рост или убивают бактерии: *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus albus*, *Staphylococcus aureus*, and *Propionibacterium*²³.

При вирусных инфекциях – вирус гриппа, ВИЧ, респираторный синцитиальный вирус, нейтрофилы в избытке привлекаются в очаги воспаления. Эти вирусы стимулируют нетоз, а ловушки захватывают и элиминируют вирусные частицы или замедляют их репликацию. Гистоны играют немаловажную роль для агрегации вирусных частиц и их нейтрализации, значительно снижая вирусную нагрузку²⁴.

Нетоз вызывают грибы, такие как *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, and *Cryptococcus* spp. посредством распознавания бета-глюканов на гифах грибов компонентами внеклеточного матрикса или путем активации оксидами азота. Было обнаружено, что нейтрофильные ловушки важны для захватывания и

²³ Delgado-Rizo V, Martínez-Guzmán MA, Iñiguez-Gutierrez L et al (2017) Neutrophil extracellular traps and its implications in inflammation: an overview. *Front Immunol* 8:81

²⁴ Hoeksema M, Tripathi S, White M et al (2015) Arginine-rich histones have strong antiviral activity for influenza A viruses. *Innate Immun* 21:736–745. [ht tps://doi.org/10.1177/1753425915593794](https://doi.org/10.1177/1753425915593794)

удаления крупных патогенов *in vivo*, таким образом делая их важными для противогрибковой защиты²⁵.

При пневмонии как клетки-эффекторы острого воспаления нейтрофилы быстро покидают кровеносные сосуды и мигрируют в паренхиму легких и альвеолярное пространство в зону локализации бактериального патогена, причем их количество в мокроте больных пневмонией коррелирует с тяжестью течения заболевания. Стимулированные нейтрофилы очага воспаления продуцируют провоспалительные медиаторы, такие как IL-1 и IL-8, экспрессируют рецептор-антагонист IL-1 и белок воспаления для активации макрофагов (MIP-1s). Иммунная функция нейтрофилов при пневмонии главным образом ассоциируется с фагоцитозом и продукцией цитотоксических компонентов, в том числе нитроксидных и кислородных радикалов, и образованием внеклеточных ловушек, что обуславливает прямое бактерицидное воздействие клеток. В дебюте воспаления нейтрофилы запускают цепную реакцию с выделением бактерицидных веществ и формируют локальный дисбаланс с преобладанием эффекторной функции. При экспериментальной пневмококковой пневмонии показано, что для эффективного иммунного ответа необходим интерферон γ , единственным источником которого в легких служат нейтрофилы. Нейтрофилы играют ключевую роль в патогенезе широкого спектра заболеваний, выступая на стороне «хозяина», а иногда и против него, в том числе при респираторных инфекциях.

Роль нейтрофилов при развитии пневмонии не всегда можно рассматривать как однозначно положительную. Если активированные нейтрофилы не удаляются из инфильтрата, персистенция таких клеток приводит к повреждению окружающих тканей, что в дальнейшем провоцирует развитие острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС). У больных пневмонией при тяжелом течении заболевания повышается содержание в периферической крови CD64+ популяции нейтрофилов, которое коррелирует с повышенным уровнем С-реактивного белка. В ядрах нейтрофилов отмечают активность регуляторного фактора транскрипции NF- κ B, который запускает синтез

²⁵ Branzk N, Lubojemska A, Hardison SE et al (2014) Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat Immunol* 15:1017–1025. <https://doi.org/10.1038/ni.2987>

белка р65, который активирует преимущественно киназы, в связи с чем увеличивается продукция провоспалительных цитокинов. Выделяя различные цитокины и эйкозаноиды нейтрофилы аффлектируют сигналы для участников иммунного ответа организма. Обнаружена корреляция между высокой степенью активности нейтрофилов и уровнем летальности от пневмонии, что указывает на их значение при неблагоприятном исходе заболевания²⁶.

²⁶ Плехова Наталья Геннадьевна, Кодрашова Н.М., Гельцер Б.И., Котельников В.Н. Клеточно-молекулярные факторы врожденной защиты и их роль в патогенезе пневмонии // Иммунология. 2017. №2. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/kletochno-molekulyarnye-factory-vrozhdennoy-zaschity-i-ih-rol-v-patogeneze-pnevmonii>.

РАЗДЕЛ 5. РОЛЬ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ЛОВУШЕК ПРИ ИНФЕКЦИИ COVID-19

У пациентов с COVID-19 повышение Д-димера ассоциируется с тяжелым течением заболевания и смертностью. При COVID-19 сообщают о венозной тромбоэмболии (ВТЭ) и об артериальных тромботических явлениях, включая ишемические инсульты. Как результат синдрома системного воспалительного ответа (SIRS) и воспаления, а также следствие острых тромботических событий возможно повреждение миокарда. В отчетах по аутопсии при COVID-19 содержатся сведения о наличии в микрососудистых тромбах многочисленных нейтрофилов, частично разрушенных. У пациентов с тяжелым течением COVID-19 повышены сывороточные маркеры активации нейтрофилов и образования NETs. Активация нейтрофилов, измеренная в сыворотке крови, коррелировала с ВТЭ у пациентов с COVID-19, а иногда и предшествовала ей. Нейтрофильные ловушки увеличивают внутрисосудистый тромбоз. NETs иницируют как внешние, так и контактные пути, способствуя презентации тканевого фактора, активации фактора XII (FXII), а также захвату и активации тромбоцитов²⁷.

Нейтрофильные сети считают связующим звеном инфекции и тромбоза при Covid-19²⁸. В ответ на сильную стимуляцию нейтрофилы и в меньшей степени моноциты и эозинофилы высвобождают внеклеточные ловушки, состоящие из ДНК и гистонов, в процессе, известном как NETоз. Циркулирующие бесклеточные нуклеиновые кислоты (cf)-это ДНК и РНК, присутствующие либо в сыворотке, либо в плазме. Циркулирующая cf-ДНК у здоровых людей происходит в основном из апоптотических клеток и ограничена до небольших и однородных фрагментов ДНК из 188-200 пар оснований. Напротив, cf-ДНК, высвобождаемая в

²⁷ Colling ME, Kanthi Y. COVID-19-associated coagulopathy: An exploration of mechanisms. *Vasc Med.* 2020 Oct;25(5):471-478. doi: 10.1177/1358863X20932640. Epub 2020 Jun 19. PMID: 32558620; PMCID: PMC7306998

²⁸ Becker RC. COVID-19 update: Covid-19-associated coagulopathy. *J Thromb Thrombolysis.* 2020 Jul;50(1):54-67. doi: 10.1007/s11239-020-02134-3. PMID: 32415579; PMCID: PMC7225095.

условиях инфекции, является результатом клеточного и тканевого некроза, апоптоза, аутофагии или митотической катастрофы. SARS-CoV-2-это РНК-вирус. Это может быть патологически и клинически значимо по нескольким причинам. cf-РНК может инициировать коагуляцию, служа кофактором для аутоактивации фактора VII-активирующей протеазы. Было обнаружено, что внеклеточная РНК активирует протеазы контактной системы коагуляции, включая факторы XI и XII, которые проявляют сильное связывание с РНК. Введение РНК провоцировало тромботический ответ, и РНК, экспонированная после повреждения сосудов с хлоридом железа ($FeCl_3$), была менее протромботической у мышей, предварительно обработанных РНКазой. Таким образом, в условиях, характеризующихся повреждением тканей, внеклеточная РНК служит матрицей для контактного активационно-зависимого тромбоза.

Тканевые нейтрофильные ловушки вызывают активацию тромбоцитов и тромбоз, возможно, с помощью связанных с сетью гистонов, которые могут индуцировать агрегацию тромбоцитов через toll-подобные рецепторы (TLR) на тромбоцитах и других клетках. Передача сигнала в тромбоцитах активирует основной рецептор адгезии тромбоцитов-интегрин $\alpha IIb\beta_3$, который опосредует агрегацию тромбоцитов, а также высвобождение гранул, экспрессию фосфатидилсерина, экспрессию FV/Va и образование тромбина. Признано, что нейтрофильные ловушки являются связующим звеном между воспалением, коагуляцией и тромбозом как локально, так и системно при различных состояниях.

При оценке патологических изменений при инфекции SARS-CoV-2 в образцах легких у пациентов с заболеванием на ранней стадии обнаруживали характерные признаки ОРДС и доказательства окклюзии мелких сосудов. Существует несколько механизмов, с помощью которых SARS-CoV-2 инфекция может привести к микрососудистым и макрососудистым тромбозам, а также цитокиновому шторму с активацией лейкоцитов, эндотелия и тромбоцитов, из-за чего происходит повышение тканевого фактора, активация коагуляции, образование тромбина и фибрина, нарушение регулирования коагуляции с дисбалансом PAI-1, ингибитора пути тканевого фактора и активированного протеина С, что в свою очередь стимулирует образование фибрина с ограничением фибринолиза, гипоксическую вазо-окклюзию, и прямое вирусное действие на активацию клеток. Развитию COVID-

19-ассоциированной коагулопатии способствует непосредственное инфицирование пневмоцитов II типа и эндотелиальных клеток, что приводит к нарушению барьерной функции и повышению проницаемости; воспалительные реакции характеризуются активацией Т-клеток, нейтрофилов, моноцитов, макрофагов и тромбоцитов, в большом объеме высвобождаются провоспалительные цитокины (включая IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α), моноцитарные тканевые факторы (monocyte-derived TF) и экспрессии PAI -1; и в итоге образуются микрососудистые и макрососудистые тромбы, состоящие из фибрина, нейтрофильных внеклеточных ловушек и тромбоцитов (Рис. 8)²⁹.

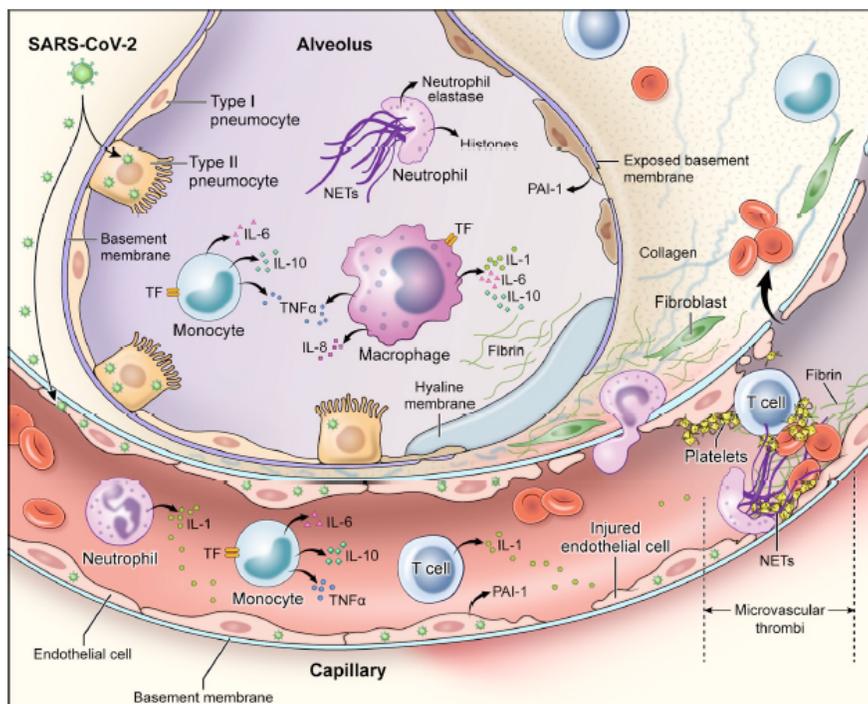


Рис. 9. Иммунная активация и механизмы коагулопатии у пациентов с COVID-19

²⁹ Colling ME, Kanthi Y. COVID-19-associated coagulopathy: An exploration of mechanisms. *Vasc Med.* 2020 Oct;25(5):471-478. doi: 10.1177/1358863X20932640. Epub 2020 Jun 19. PMID: 32558620; PMCID: PMC7306998.

Все еще активно исследуется, специфичны ли эти изменения для инфекции SARS-CoV-2 или являются конечным общим результатом в тромбо-воспалительном ответе на вирусные инфекции и маркером тяжести заболевания. Ранние отчеты об аутопсии при COVID-19 также выявили возможную роль нейтрофилов, поскольку микрососудистые тромбы содержали многочисленные нейтрофилы, которые в некоторых случаях были частично разрушены, что согласуется с концепцией о нейтрофильных внеклеточных ловушках (сетях). Нейтрофильные ловушки, состоящие из клубков ДНК, высвобождаемой из нейтрофилов, декорированных антимикробными и ядерными белками, увеличивают внутрисосудистый тромбоз. Нейтрофильные ловушки инициируют как внешние, так и контактные пути, способствуя презентации тканевого фактора, активации фактора XII (FXII), а также захвату и активации тромбоцитов. В соответствии с этими наблюдениями у пациентов с тяжелым течением COVID-19 повышены сывороточные маркеры активации нейтрофилов и образования ловушек. В одном исследовании активация нейтрофилов, измеренная в сыворотке крови, коррелировала с VTE у пациентов с COVID-19, а иногда и предшествовала ему.

Появляется все больше научных данных, о том, что избыточное образование нейтрофильных экстраклеточных ловушек вызывает гемокоагуляцию. С момента открытия нейтрофильных ловушек взгляд на патофизиологию тромбозов существенно изменился. Нетоз запускается контактом активированного нейтрофила с фосфатидилсеринем – мембранным липидом, локализованным на поверхности апоптозирующих клеток. Вместе с тем воздействие фосфатидилсерина на активированные нейтрофилы является ключевым событием в патогенезе микрососудистой дисфункции. Проведенные исследования выявляют ранее непризнанную связь между гиперкоагуляцией и присутствием фосфатидилсерина в циркуляции, что обуславливает очевидный тромботический риск. Тромботические осложнения представляют серьезную опасность в целом ряде заболеваний. Генерируемые нейтрофилами сети, состоящие из деконденсированного хроматина в виде волокон, способствуют образованию тромба, служа каркасом, активирующим тромбоциты и коагуляцию. Тромбогенное поражение сосудов, обусловленное избыточным образованием нейтрофильных экстраклеточных ловушек, было описано при различных условиях тромбоза, включая инсульт, инфаркт миокарда и тромбоз глубоких вен.

В патогенезе коронавирусной инфекции (COVID-19) просматривается отчетливая связь между развитием системной коагулопатии и формированием нейтрофильных экстраклеточных ловушек. Причем наиболее тяжелые в клиническом отношении пациенты это те, у которых развивается вирус-индуцированный апоптоз только в части инфицированных клеток. Эти клетки экспрессируют фосфатидилсерин на поверхности и индуцируют раскрытие нейтрофильных экстраклеточных ловушек, которые захватывают апоптозирующие клетки и их остатки. Другая часть инфицированных клеток не входит в апоптоз из-за функциональной недостаточности MAVS, поверхностного белка наружной митохондриальной мембраны с прионоподобной активностью, способного изменять конформацию при взаимодействии с вирусной РНК. Оставшиеся жизнеспособными инфицированные клетки участвуют в вирусной репликации и поддерживают распространение вируса по организму. Распространение вируса по организму увеличивает число апоптозирующихся клеток и, соответственно, количество раскрывающихся нейтрофильных экстраклеточных ловушек.

Нейтрофилы при формировании экстраклеточных ловушек секретируют воспалительные цитокины, ферменты, активные формы кислорода (АФК), пептиды с порообразующей активностью. Часть секретируемых продуктов – АФК, пептиды с порообразующей активностью (такие как LL-37), TNF α предназначены для повреждения и уничтожения микроорганизмов. Но в отсутствии бактериальной инфекции повреждению подвергаются собственные ткани и клетки крови. Эндотелиоциты капилляров малого круга становятся пористыми, что ведет к интерстициальному отеку в легких, развитию вирусной пневмонии, а увеличение проницаемости мембран эритроцитов и тромбоцитов вызывает потерю гемоглобина и гемокоагуляцию. Эту концепцию поддерживают исследования больных с COVID-19 с пневмонией, у которых обнаружили нейтрофильные экстраклеточные ловушки в микрососудах малого круга вместе с поврежденными эндотелиальными клетками и отложениями фибрина³⁰.

³⁰ Александр Николаевич Казимирский, Ж. М. Салмаси, Г. В. Порядин Антивирусная система врожденного иммунитета: патогенез и лечение COVID-19 // Вестник РГМУ. 2020. №5. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/antivirusnaya-sistema-vrozhdennogo-immuniteta-patogenez-i-lechenie-covid-19>

В развитии пневмонии и/или ОРДС при COVID-19, вероятно, может участвовать чрезмерный ответ нейтрофилов и образование внеклеточных нейтрофильных ловушек, поскольку обширная продукция ловушек также вызывает острые повреждения сердца и почек, которые часто встречаются у пациентов с тяжелой формой COVID-19. Неконтролируемое и прогрессирующее воспаление вследствие цитокинового шторма вызывается нарушением взаимодействия между макрофагами и нейтрофилами, нейтрофилия служит предиктором неблагоприятного исхода у пациентов с COVID-19. ДНК и гистоны в составе нейтрофильных ловушек активируют тромбоциты и каскад свертывания крови. Ловушки образуют агрегаты, называемые агрегированные нейтрофильные ловушки, которые служат остовом для эритроцитов и активированных тромбоцитов. В то же время эластаза инактивирует главные ингибиторы свертывания – антитромбин III и ингибитор пути тканевого фактора (TFPI), и дальнейшее образование тромбов в кровеносных сосудах происходит с последующим повреждением легких, сердца и почек. Остов нейтрофильных внеклеточных ловушек, декорированный тканевым фактором (TF) и интерлейкином-17A (IL-17A), участвует в развитии тромбовоспаления и фиброза легких у пациентов с системной красной волчанкой (СКВ). IL-17A – провоспалительный цитокин, который связан с усилением и распространением фиброзного процесса в нескольких различных тканях, включая легкие, кожу, печень и другие, но не затрагивает почки. У пациентов с СКВ нейтрофильные ловушки, которые образуются вследствие нарушения механизмов аутофагии, обогащены белками TF и IL-17A, оба из которых активно функционируют: TF вызывают образование тромбина, а IL-17A способствует отложению коллагена³¹.

В работе Zuo Y. с соавт. в журнале «Journal of Thrombosis and Thrombolysis» в 2021 году опубликовано исследование, посвященное тромбозу при COVID-19. Ученые выделили 2 группы пациентов с COVID-19: без тромбоза и с тромбозом. Сывороточные маркеры активации нейтрофилов – кальпротектин, свободная ДНК, комплексы МПО-ДНК, цитрулинированные гистоны, были выше в группе паци-

³¹ Sabbatini M, Magnelli V, Renò F. NETosis in Wound Healing: When Enough Is Enough. Cells. 2021 Feb 25;10(3):494. doi: 10.3390/cells10030494. PMID: 33668924; PMCID: PMC7996535

ентов с тромбозом. Даже на небольшой когорте пациентов (44 человека) была выявлена их корреляция с уровнем D-димера и количеством тромбоцитов (рис. 9)³².

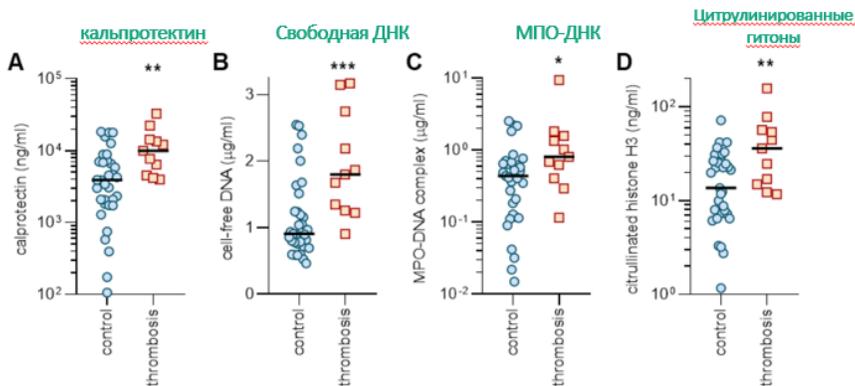


Рис. 10. Отличия уровней маркеров активации нейтрофилов в двух группах пациентов с COVID-19: без тромбоза (контроль, круглые метки) и с тромбозом (квадратные метки)

³² Zuo Y, Zuo M, Yalavarthi S, Gockman K, Madison JA, Shi H, Woodard W, Lezak SP, Lugogo NL, Knight JS, Kanthi Y. Neutrophil extracellular traps and thrombosis in COVID-19. *J Thromb Thrombolysis*. 2021 Feb;51(2):446-453. doi: 10.1007/s11239-020-02324-z. Epub 2020 Nov 5. PMID: 33151461; PMCID: PMC7642240.

РАЗДЕЛ 6. РОЛЬ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ЛОВУШЕК В ПАТОГЕНЕЗЕ СЕПСИСА

Согласно новым рекомендациям, «Сепсис-3» установлены следующие определения сепсиса, как «угрожающая жизни органная дисфункция, вызванная нарушением регуляции реакции хозяина на инфекцию», и септического шока – наиболее опасного варианта сепсиса, как «сепсис, при котором клеточные и циркуляторные аномалии выражены настолько, что существенно увеличилась смертность».

Сепсис возникает как следствие чрезмерного иммунного ответа на инфекцию. Согласно «микробной теории» заболеваний (“germtheory») изначально считалось, что последующие за инфекцией воспаление, нарушение функции органов и смерть, развивались исключительно из-за ответа организма на микробные продукты, так называемые патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMPs). PAMPs распознаются рецепторами на иммунных клетках – рецепторами распознавания паттерна (PRRs). Многочисленными исследованиями продемонстрирована роль PAMPs и PRRs в активации иммунного ответа и развитии сепсиса. Последующие работы выявили другие молекулы – ассоциированные с повреждением молекулярные паттерны (DAMPs), включающие не микробные продукты, а компоненты клеток хозяина, нуклеиновые кислоты, вещества из цитоплазмы. DAMPs служат сильным активатором разворачивания иммунного ответа, способствуют неинфекционной воспалительной реакции и вызывают системное воспаление, повреждение органов и смерть. DAMPs и PAMPs распознаются одними и теми же рецепторами PRRs и сигнал от них передается внутрь клетки по одним и тем же сигнальным каскадам, приводя в итоге к общему последствию – активации иммунной системы. К DAMPs относятся HMGB1, гистон H3, РНК-связывающий протеин eCIRP, и их повышенный уровень при сепсисе коррелирует с повышенными тяжестью и смертностью. Часть PRR рецепторов находится внутри клетки.

В цитоплазме нейтрофилов экспрессируются NLR рецепторы – Nucleotide binding and oligomerization domain-like receptors. На на-

стоящий момент у человека идентифицировано 23 члена семейства рецепторов NLRs, которые отличаются по аминотерминальному эффекторному участку и играют важную роль при воспалении³³. NLRs экспрессируются в цитоплазме моноцитов/макрофагов, нейтрофилов, лимфоцитов, характеризуются высоким уровнем специфичности и играют важную роль в распознавании PAMPs, DAMPs. Установлено, что NLR1 связываются с диаминопимелиновой кислотой клеточной стенки грамотрицательных бактерий, в то время как NLR2 распознают консервативные мурамилпептидные структуры клеточной стенки всех бактерий³⁴.

Получены данные о больших количествах нейтрофильных ловушек в циркуляции у пациентов с сепсисом, это плохой прогностический признак, ассоциированный с множественной органной недостаточностью³⁵. Вероятно, из-за увеличенного нетоза, апоптоза и некроза или из-за сниженного клиренса разрушенных клеток в циркуляцию попадает свободная ДНК, усиливающая воспаление через повышение экспрессии TNF- α . Гистоны относят к молекулам DAMP, ассоциированным с повреждением тканей, они также могут стимулировать выброс провоспалительных цитокинов³⁶.

Сепсис или гипоксия активируют иммунореактивные клетки, включая макрофаги и нейтрофилы. При бактериальном сепсисе PAMPs взаимодействуют с PRR на макрофагах, активируя NF- κ B, что приводит к повышенной экспрессии DAMPs (HMGB1, CIRP, H3) на транскрипционном и трансляционном уровнях. Эти внутриклеточные DAMPs затем попадают из клетки наружу посредством различных

³³ Koppe U., Suttorp N., Opitz B. Recognition of *Streptococcus pneumoniae* by the innate immune system. *Cell. Microbiol.* 2012; 14(4): 460—6. doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01746.x.

³⁴ Witznath M., Pache F., Lorenz D., Koppe U., Gutbier B. et al. The NLRP3 inflammasome is differentially activated by pneumolysin variants and contributes to host defense in pneumococcal pneumonia. *J. Immunol.* 2011; 187(1): 434—40. doi: 10.4049/jimmunol.1003143.

³⁵ Li RHL, Tablin F (2018) A comparative review of neutrophil extracellular traps in sepsis. *Front Vet Sci* 5:291

³⁶ Ekaney ML, Otto GP, Sosdorf M et al (2014) Impact of plasma histones in human sepsis and their contribution to cellular injury and inflammation. *Crit Care* 18:543. <https://doi.org/10.1186/s13054-014-0543-8>

механизмов, таких как активация газдермина D (GSDMD), опосредованная инфламмасомой, которая вызывает повышенное образование пор в мембране для высвобождения внутриклеточных DAMPs. Эти DAMPs, в свою очередь, могут распознаваться с помощью PRR на окружающих нейтрофилах и активировать PAD4, газдермин D, способствуя образованию ловушек.

Компоненты нейтрофильных ловушек, такие как гистоны H3, МРО или ДНК, могут дополнительно активировать иммунные клетки и эндотелиальные клетки, высвобождая повышенные уровни DAMPs для усиления воспалительного каскада. В эпителиальных клетках внеклеточные гистоны, проходящие из NETs, способствуют повреждению клеток/тканей, что приводит к увеличению тяжести повреждения (Рис. 11)³⁷.

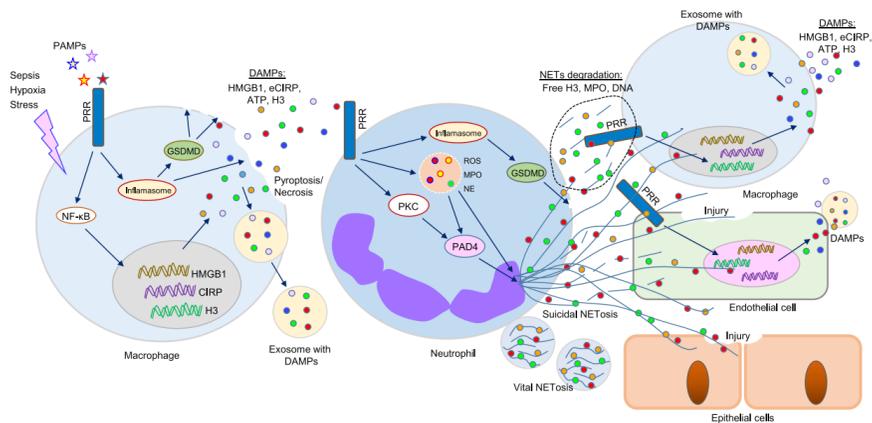


Рис. 11. Взаимосвязь между повреждением тканей и нетозом при сепсисе

³⁷ Denning NL, Aziz M, Gurien SD, Wang P. DAMPs and NETs in Sepsis. Front Immunol. 2019 Oct 30;10:2536. doi: 10.3389/fimmu.2019.02536. PMID: 31736963; PMCID: PMC6831555.

РАЗДЕЛ 7. РОЛЬ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ЛОВУШЕК В ПАТОГЕНЕЗЕ АУТОИММУННЫХ И АУТОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Нейтрофильные ловушки определяются при аутоиммунных заболеваниях. При псориазе нейтрофилы собираются в псориатических бляшках и формируют кластеры, где выделяются провоспалительные цитокины (IL-6, IL-8, IL-17), в конечном итоге запускающие нетоз^{38, 39}. При системной красной волчанке возможно продуцирование аутоантител против нуклеиновых кислот, высвободившихся из нейтрофилов в результате нетоза⁴⁰. У пациентов с ревматоидным артритом нейтрофилы инфильтрируют синовиальные полости и такие нейтрофилы активно формируют ловушки⁴¹. Циркулирующие нейтрофилы пациентов с ревматоидным артритом более легко стимулируются к образованию ловушек, чем у здоровых людей и у пациентов с другими аутоиммунными состояниями⁴². Ловушки служат источником внеклеточных аутоантигенов, приводя к избыточному врожденного и иммунного ответа, с нарушением функции суставов и повреждению тканей⁴³. При сахарном диабете II типа у пациентов существует риск развития нейтропении, нейтрофилы могут быть обнаружены в инфильтрате в островках поджелудочной железы, где нетозу способствует высокая концентрация цитокина TNF- α , в свою

³⁸ Hoffmann JHO, Enk AH (2016) Neutrophil extracellular traps in dermatology: caught in the NET. *J Dermatol Sci* 84:3–10

³⁹ Pinegin B, Vorobjeva N, Pinegin V (2015) Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 14:633–640

⁴⁰ Pan L, Lu MP, Wang JH et al (2020) Immunological pathogenesis and treatment of systemic lupus erythematosus. *World J Pediatr* 16:19–30

⁴¹ Hidalgo AI, Carretta MD, Alarcón P et al (2019) Proinflammatory mediators and neutrophils are increased in synovial fluid from heifers with acute ruminal acidosis. *BMC Vet Res* 15:1–10. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1974-x>

⁴² Apel F, Zychlinsky A, Kenny EF (2018) The role of neutrophil extracellular traps in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 14:467–475

⁴³ Wigerblad G, KaplanMJ (2020) NETs spread ever wider in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 16:73–74

очередь общий цитокиновый фон в этом процессе приводит к привлечению еще большего числа нейтрофилов в очаг воспаления⁴⁴. При васкулитах мелких сосудов формируются анти-нейтрофильные антитела (ANCA), протеины высвобождающиеся при нетозе, являются главным источником образования ANCA антител. Более того сами ANCA антитела способствуют нетозу во время активного заболевания⁴⁵.

У пациентов с диабетом вследствие формирования нейтрофильных ловушек происходит задержка заживления ран. Усиленное формирование ловушек, опосредованное пептидиларгининдезаминазой 4 (PAD4), связано с повышенным выделением эластазы, которая отвечает за деградацию внеклеточного матрикса и задержку заживления ран. Кроме того, у нокаутных по гену PAD4 (Padi4^{-/-}) мышей с диабетом заживление ран ускоряется. Важность чрезмерной продукции нейтрофильных внеклеточных ловушек в контексте проявления или прогрессирования заболевания получила дальнейшие подтверждения в эффективности лечения диабета метформином. Метформин – хорошо известный лекарственный препарат первой линии для лечения сахарного диабета второго типа, и в дополнение к его недостаточно ясному механизму снижения уровня глюкозы было выявлено, что он способен уменьшать концентрацию компонентов нейтрофильных ловушек путем ингибирования пути РКС/НАДФН-оксидазы, который ответственен за первые метаболические стадии, ведущие к образованию нейтрофильных ловушек. И снова эти результаты подтверждают, что наблюдаемое повреждение ткани, вызванное нейтрофильными ловушками, лишь отражает изменения в их образовании и само по себе не служит проявлением вредоносного механизма защиты.

Модель нарушения регуляции нетоза, вызывающего хроническое воспаление, хорошо проявляется на примере псориаза. Патогенез псориаза зависит от уровней IL-17 и IL-23, и для контроля заболевания используются препараты, действие которых направлено на эти

⁴⁴ Berezin A (2019) Neutrophil extracellular traps: the core player in vascular complications of diabetes mellitus. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev* 13:3017–3023

⁴⁵ Nakazawa D, Tomaru U, Yamamoto C et al (2012) Abundant neutrophil extracellular traps in thrombus of patient with microscopic polyangiitis. *FrontImmunol* 3. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00333>

цитокины. Эффективность данного способа лечения связывают с подавлением выработки IL-17 определенным подтипом Т-лимфоцитов (называемыми Th17) и блокированием их распространения, которое вызывается IL-23, IL-21 и IL-1 β . Однако основными источниками IL-17 в коже и при псориазе служат тучные клетки и нейтрофилы. В частности, IL-17 выделяется при формировании нейтрофилами внеклеточных ловушек, в то время как IL-23 и IL-1 β участвуют в дегрануляции и создании внеклеточных ловушек тучными клетками⁴⁶.

Аутовоспалительные заболевания – это группа состояний, характеризующаяся рецидивирующими воспалительными атаками с вовлечением различных органов и систем⁴⁷. В отличие от аутоиммунных заболеваний в инициации аутовоспалительных болезней играют роль, главным образом, генетически детерминированные реакции иммунитета и воспаления, а не механизмы, связанные с антигениндуцированным синтезом антител или активацией Т-лимфоцитов. Группа аутовоспалительных заболеваний включает в себя семейные периодические лихорадки (периодическую болезнь, синдром Макла–Уэллса и др.), наиболее частым осложнением которых является вторичный АА-амилоидоз. Молекулярно-генетические исследования показали, что важнейшим механизмом аутовоспаления является нейтрофильное воспаление, ассоциированное с гиперпродукцией интерлейкина-1.

Подагра это аутовоспалительное заболевание, при котором в суставах происходит отложение кристаллов урата мононатрия. Стимулируется привлечение лейкоцитов, в том числе нейтрофильных ловушек и развивается воспаление⁴⁸. Воспалительные заболевания кишечника – заболевания затрагивающие желудочно-кишечный тракт с развитием хронического неконтролируемого воспаления. Основными вос-

⁴⁶ Sabbatini M, Magnelli V, Renò F. NETosis in Wound Healing: When Enough Is Enough. *Cells*. 2021 Feb 25;10(3):494. doi: 10.3390/cells10030494. PMID: 33668924; PMCID: PMC7996535

⁴⁷ Рамеев В. В., Козловская Л. В. Аутовоспалительные заболевания: общее понятие, механизмы развития, клиническая картина, подходы к лечению // *Нефрология*. 2012. №2. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/autovospalitelnye-zabolevaniya-obshche-ponyatie-mehanizmy-razvitiya-klinicheskaya-kartina-podhody-k-lecheniyu> (дата обращения: 21.11.2022).

⁴⁸ Desai J, Steiger S, Anders HJ (2017) Molecular pathophysiology of gout. *Trends Mol Med*

палительными заболеваниями кишечника являются язвенный колит и болезнь Крона, у них разная этиология, патогенез и диагностические признаки. При болезни Крона развивается воспаление подвздошной и толстой кишки. Нейтрофильные ловушки при болезни Крона еще не полностью изучены, но есть свидетельства о том, что идет большее образование активных форм кислорода, и это может приводить к некрозу. При язвенном колите воспаление происходит главным образом в толстой кишке, и нейтрофильные ловушки там наблюдают параллельно с нарастанием воспаления.

РАЗДЕЛ 8. РОЛЬ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ЛОВУШЕК ПРИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Начиная с 2013 г. стали появляться исследования роли нейтрофильных ловушек при опухолях, о регулировании ими противоопухолевого иммунного надзора, участии их в прогрессировании и метастазировании, а также роли в опухоль-ассоциированном тромбозе⁴⁹. Ловушки могут оказывать противоопухолевое действие, за счет содержимого гранул (миелопероксидаза, протеиназы, гистоны), замедляя рост опухоли и метастазирование. Но ловушки могут и стимулировать опухолеобразование, поскольку протеиназы ловушек разрушают межклеточный матрикс, помогая опухолевым клеткам проникать в здоровые ткани. Позднее оказалось, что сами ловушки могут служить местом прикрепления, адгезионным субстратом⁵⁰, для опухолевых клеток, улавливая их и таким образом способствуя метастазированию⁵¹. Ловушки находят в периферической крови онкологических пациентов, предположительно они могут вызывать повреждение органов, как при аутоиммунных заболеваниях. Опухолевые клетки выделяют вещества (G-CSF, IL-8)^{52, 53}, запускающие нетоз, вероятно

⁴⁹ Homa-Mlak I, Majdan A, Mlak R, Malecka-Massalska T. Metastatic potential of NET in neoplastic disease. *Postepy Hig Med Dosw.* (2016) 70:887–95. doi: 10.5604/17322693.1216275

⁵⁰ Monti M, De Rosa V, Iommelli F, Carriero MV, Terlizzi C, Camerlingo R, et al. Neutrophil extracellular traps as an adhesion substrate for different tumor cells expressing RGD-binding integrins. *Int J Mol Sci.* (2018) 19:2350. doi: 10.3390/ijms19082350

⁵¹ Kanamaru R, Ohzawa H, Miyato H, Yamaguchi H, Hosoya Y, Lefor AK, et al. Neutrophil extracellular traps generated by low density neutrophils obtained from peritoneal lavage fluid mediate tumor cell growth and attachment. *J Vis Exp.* (2018) 138:58201. doi: 10.3791/58201

⁵² Gonzalez-Aparicio M, Alfaro C. Influence of interleukin-8 and neutrophil extracellular trap (NET) formation in the tumor microenvironment: is there a pathogenic role? *J Immunol Res.* (2019) 2019:6252138. doi: 10.1155/2019/6252138

⁵³ Avalos BR, Gasson JC, Hedvat C, Quan SG, Baldwin GC, Weisbart RH, et al. Human granulocyte colony-stimulating factor: biologic activities and receptor characterization on hematopoietic cells and small cell lung cancer cell lines. *Blood.* (1990) 75:851–7

поэтому нейтрофильные ловушки могут быть обнаружены в тканях, окружающих опухоль⁵⁴.

На моделях опухолей у экспериментальных мышей наблюдали изменения сосудов, в тканях почек было много нейтрофилов, в том числе в комплексе с тромбоцитами, свидетельствующими о формировании ловушек. При лечении животных ДНКазами функция почек восстанавливалась почти до уровня здоровых животных, что указывает на роль нетоза в патогенезе⁵⁵. При экспериментальной аденокарциноме поджелудочной железы нейтрофильные ловушки и тромбоциты предположительно играют роль в гиперкоагуляции крови, повышая риск венозной тромбоэмболии⁵⁶.

Многочисленные данные свидетельствуют о более высоком содержании нейтрофильных ловушек в плазме и опухолевой ткани онкологических пациентов: при раке легких, поджелудочной железы, колоректальном раке, раке молочной железы (особенно при трижды негативном). Наличие ловушек было ассоциировано с плохим прогнозом таких пациентов⁵⁷.

Длительное время считалось, что нейтрофилы остаются инертными по отношению к раковым клеткам во время роста опухоли и метастазирования. Однако в недавнем исследовании пациентов с саркомой Юинга в 25 % случаев NETs были найдены внутри опухоли. Впоследствии у этих пациентов появились метастазы, что указывает на то, что внеклеточные нейтрофильные ловушки могут способствовать прогрессированию опухоли.

⁵⁴ Snoderly HT, Boone BA, Bennewitz MF. Neutrophil extracellular traps in breast cancer and beyond: current perspectives on NET stimuli, thrombosis and metastasis, and clinical utility for diagnosis and treatment. *Breast Cancer Res.* (2019) 21:145. doi: 10.1186/s13058-019-1237-6

⁵⁵ Cedervall J, Zhang Y, Huang H, Zhang L, Femel J, Dimberg A, et al. Neutrophil extracellular traps accumulate in peripheral blood vessels and compromise organ function in tumor-bearing animals. *Cancer Res.* (2015) 75:2653–62. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3299

⁵⁶ Boone BA, Murthy P, Miller-Ocuin J, Doerfler WR, Ellis JT, Liang X, et al. Chloroquine reduces hypercoagulability in pancreatic cancer through inhibition of neutrophil extracellular traps. *BMC Cancer.* (2018) 18:678. doi: 10.1186/s12885-018-4584-2

⁵⁷ Richardson JJR, Hendrickse C, Gao-Smith F, Thickett DR. Neutrophil extracellular trap production in patients with colorectal cancer in vitro. *Int J Inflam.* (2017) 2017:4915062. doi: 10.1155/2017/4915062

В исследовании, сравнивающем две линии мышей с раком молочной железы (метастатическим и не метастатическим), было обнаружено большое количество нейтрофилов в местах имплантации метастаз, где они формировали внеклеточные ловушки, однако в местах имплантации не метастатических клеток они найдены не были.

В последние годы внеклеточные нейтрофильные ловушки интересны не только как фактор врожденного иммунитета, их также изучают с позиции участия в патогенезе различных заболеваний. Очевидно, что неконтролируемое избыточное или недостаточное формирование NETs может иметь серьезные последствия. Однако необходимо более точно определить их роль в механизмах развития различных заболеваний, поскольку это может открывать новые, более прогрессивные методы диагностики и лечения болезней.

Была обнаружена роль нейтрофильных ловушек в нарушении гемостаза у онкопациентов. Ловушки способствуют развитию опухоль-ассоциированного тромбоза, явлением, связанным с очень плохим прогнозом. Была обнаружена связь одновременно повышенного уровня нейтрофильных ловушек и маркеров гиперкоагуляции. Более того, повышенный маркер нетоза цитруллинированный гистон у онкологических пациентов четко коррелировал с нейтрофильной эластазой, миелопероксидазой, IL-6, IL-8 – все они активаторы нетоза^{58, 59}.

У онкологических пациентов наиболее частым и опасным осложнением является венозная тромбоэмболия. Известно, что сами опухолевые клетки обладают прокоагулянтной активностью, способствуя гиперкоагуляции. На различных моделях и при разной локализации опухолей показана связь тромбоза и формирования нейтрофильных ловушек. Нетоз у онкологических пациентов способны запускать как тромбоциты, так и клетки опухоли. В свою очередь нейтрофильные ловушки усиливают коагуляцию, наблюдается ко-

⁵⁸ Tohme S, Yazdani HO, Al-Khafaji AB, Chidi AP, Loughran P, Mowen K, et al. Neutrophil extracellular traps promote the development and progression of liver metastases after surgical stress. *Cancer Res.* (2016) 76:1367–80. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1591

⁵⁹ Thålin C, Lundström S, Seignez C, Daleskog M, Lundström A, Henriksson P, et al. Citrullinated histone H3 as a novel prognostic blood marker in patients with advanced cancer. *PLoS ONE.* (2018) 13:e0191231. doi: 10.1371/journal.pone.0191231.

релляция с уровнем Д-димера, ТАТ-комплекса. Немаловажен вклад нейтрофильных ловушек в повреждение эндотелия, способствующее тромбозам⁶⁰.

⁶⁰ Li JC, Zou XM, Yang SF, Jin JQ, Zhu L, Li CJ, Yang H, Zhang AG, Zhao TQ, Chen CY. Neutrophil extracellular traps participate in the development of cancer-associated thrombosis in patients with gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2022 Jul 14;28(26):3132-3149. doi: 10.3748/wjg.v28.i26.3132. PMID: 36051331; PMCID: PMC9331535.

РАЗДЕЛ 9. РОЛЬ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ЛОВУШЕК В ПАТОЛОГИИ ТРОМБООБРАЗОВАНИЯ

Связь нейтрофилов с тромбовоспалением впервые была выявлена 70 лет назад. Гранулоциты были описаны как основной компонент сгустков крови у пациентов с активной формой системной красной волчанки. В последующие годы в ряде исследований было показано накопление нейтрофилов в участках формирования тромба, однако их вклад в развитие тромботических состояний оставался не изучен. Ситуация изменилась в тот момент, когда выяснилось, что нейтрофилы являются первичным источником тканевого фактора (ТФ), основного активатора внешнего пути свертывания. Позже в лабораторных исследованиях была доказана большая роль нейтрофилов в развитии тромбоза и тромботических осложнений воспалительных процессов. Исследования на мышах показали, что при венозных и артериальных тромбозах с самых ранних стадий формирования тромба происходят привлечение и активация нейтрофилов в участке повреждения сосудистой стенки. Искусственно вызванная в исследованиях нейтропения препятствовала развитию как артериальных, так и венозных тромбозов⁶¹

Помимо функций гемостаза, тромбоциты все чаще признаются важными участниками воспаления. Функция тромбоцитов выходит за рамки тромбоза и гемостаза, поскольку тромбоциты взаимодействуют с множеством клеток и белков. Среди них рецепторы и белки, модулирующие тромбоз/гемостаз, например GPIIb, GPIIb/IIIa, GPVI и полифосфаты. Кроме того, тромбоциты модулируют воспаление, например, через C3aR, JAM-C, PSGL-1, P-селектин, CXCR4. GPIIb, гликопротеин Iba; GPIIb/IIIa, гликопротеин IIb/IIIa; GPVI, гликопротеин VI; C3AR, рецептор фактора комплемента 3; JAM-C, соединительная молекула адгезии C; CXCR4, C-X-C-хемокиновый рецептор типа 4 (Рис. 12)

⁶¹ Бицадзе В.О., Слуханчук Е.В., Хизроева Д.Х., Третьякова М.В., Шкода А.С., Радецкая Л.С., Макацария А.Д., Элалами И., Грис Ж.-К., Грандоне Э. Внеклеточные ловушки нейтрофилов (NETs) в патогенезе тромбоза и тромбовоспалительных заболеваний. Вестник РАМН. 2021;76(1):75–85. doi:<https://doi.org/10.15690/vramn1395>

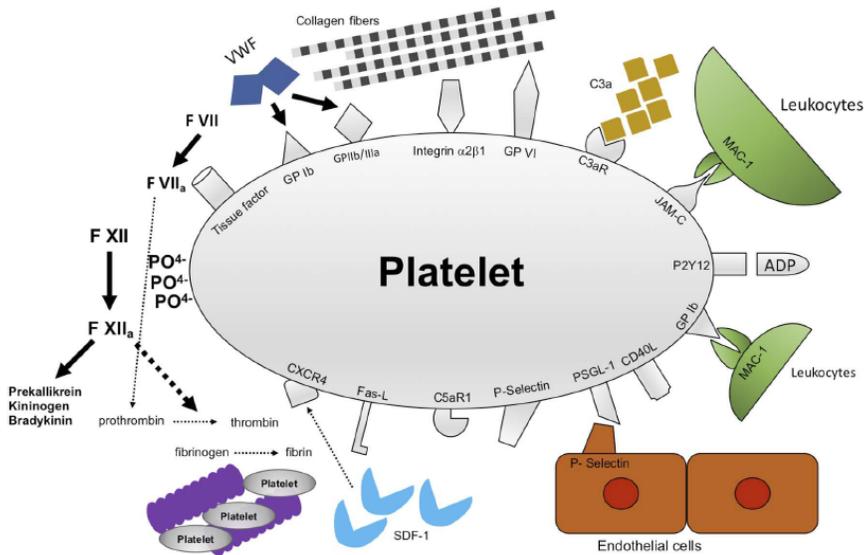


Рис. 12. Механизмы взаимодействия тромбоцитов с их микроокружением

Тромбоциты способны к синтезу белка, у них есть РНК, транскрипционный и трансляционный аппарат и они продуцируют цитокин IL-1β. Выявлены точки пересечения тромбоз- гемостаз-воспаление. Фактор XII внутреннего пути связывает активацию тромбоцитов с каскадом коагуляции во время иммунных реакций.

В 2013 Энгельманом и Массбергом был введен термин *иммуно-тромбоз*⁶². Иммунотромбоз обозначает врожденный иммунный ответ, индуцированный образованием тромбов внутри кровеносных сосудов, в частности в микрососудах. Иммунотромбоз поддерживается иммунными клетками и специфическими молекулами, связанными с тромбозом, и генерирует внутрисосудистый каркас, который облегчает распознавание, сдерживание и разрушение патогенов, тем самым защищая целостность хозяина, не вызывая серьезного сопутствующего повреждения хозяина. Однако при неконтролируемом процессе

⁶² Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. Nat Rev Immunol. 2013 Jan;13(1):34-45. doi: 10.1038/nri3345. Epub 2012 Dec 7. PMID: 23222502.

иммунотромбоз является основным биологическим процессом, способствующим развитию патологий, связанных с тромбозом.

Иммунотромбоз крайне важен для противодействия инфекции, защиты от патогенов: 1) иммунотромбоз ограничивает распространение микробов, удерживая микробы внутри тромбов; 2) тромбы образуют защитные баррикады внутри и/или вокруг кровеносных сосудов, которые ограничивают проникновение микробов в сосуды и из них; 3) фибрин, фибриноген и продукты распада фибрина/фибриногена способствуют привлечению и активации лейкоцитов, таких как нейтрофилы и макрофаги, координируя клеточные иммунные реакции на патогены в очагах инфекции; 4) образование внутри сосудистых отдельных зон, где концентрируются антимикробные пептиды, повышая возможность тесного контакта с патогенами. (рис. 12)⁶³. Тром-

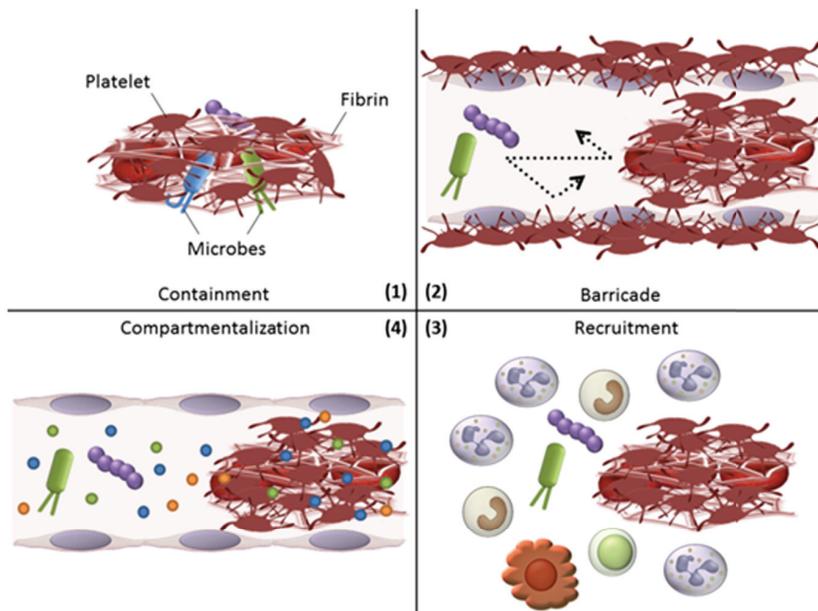


Рис. 13. Механизмы противоинфекционной защиты с помощью иммунотромбоза

⁶³ Ito T. PAMPs and DAMPs as triggers for DIC. J Intensive Care. 2014 Dec 31;2(1):67. doi: 10.1186/s40560-014-0065-0. PMID: 25705424; PMCID: PMC4336279.

бообразование и врожденный иммунитет связаны – при нарушении целостности барьеров важно предотвратить кровотечение и инфицирование. У людей для этих целей развилось две системы: система гемостаза и иммунная система. Но у древних предков ракообразных – меченосцев, эти функции выполняют одни и те же клетки. Система гемостаза у млекопитающих не менее важна для иммунной защиты от инфекций. У мышей в эксперименте применение антикоагулянтов вызывают бактериальную инфекцию. У людей тромбоцитопения все чаще признается фактором риска инфекций.

Нейтрофилы и их ловушки являются одними из триггеров иммунотромбоза. Активированные нейтрофилы высвобождают деконденсированный хроматин в комплексе с гистонами и гранулами (протеазами, которые разрушают антитромботические молекулы, такие как ингибитор пути тканевого фактора TFPI и антитромбин), цитоплазматическими белками, которые способствуют воспалению и коагуляции (тканевой фактор, факторы XI и XII). Вместе ловушки образуют каркас для агрегации клеток и образования тромбов (Рис. 14)⁶⁴.

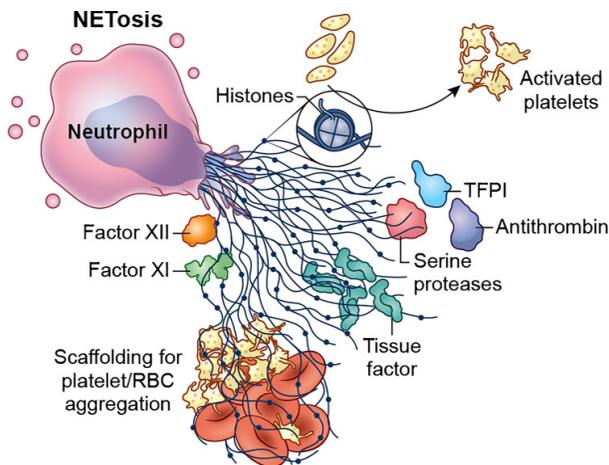


Рис. 14. Нейтрофильные ловушки способствуют тромбозу (Knight JS и соавт. 2022)

⁶⁴ Knight JS, Kanthi Y. Mechanisms of immunothrombosis and vasculopathy in antiphospholipid syndrome. *Semin Immunopathol.* 2022 May;44(3):347-362. doi: 10.1007/s00281-022-00916-w. Epub 2022 Feb 4. PMID: 35122116; PMCID: PMC8816310.

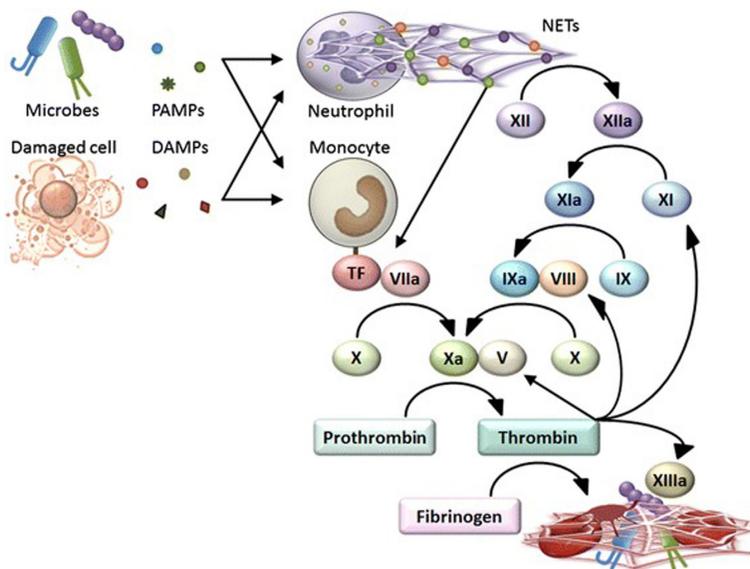


Рис. 15. Активаторы иммунотромбоза [Ito T. И соавт. 2014]

Воздействие PAMPs и DAMPs запускает высвобождение внеклеточных ловушек нейтрофилами и экспрессию тканевого фактора на моноцитах, способствуя иммунотромбозу. Ловушки способны активировать фактор свертывания крови XII, инактивировать антикоагулянт TFPI и обеспечивать каркас для связывания и агрегации тромбоцитов, все они способствуют образованию тромба. Часть тканевого фактора, ассоциированного с моноцитами, высвобождается в виде микрочастиц и доставляется в развивающиеся тромбы (рис. 14)⁶⁵.

Неконтролируемый иммунотромбоз может навредить хозяину. При сепсисе у от 25 до 50% пациентов развивается ДВС-синдром, ассоциированный с плохим прогнозом. ДВС-синдром характеризуется распространенным микрососудистым тромбозом с истощением факторов свертывания и тромбоцитов. Факторами предрасположенности к ДВС-синдрому являются тканевый фактор моноцитов и нейтрофильные ловушки. ДВС-синдром может рассматриваться как край-

⁶⁵ Ito T. PAMPs and DAMPs as triggers for DIC. J Intensive Care. 2014 Dec 31;2(1):67. doi: 10.1186/s40560-014-0065-0. PMID: 25705424; PMCID: PMC4336279.

няя стадия иммунотромбоза, при которой иммунная система более не способна ограничивать распространение молекул PAMP/ DAMP по всему организму, и иммунотромбоз начинает преобладать. На этой стадии иммунотромбоз вызывает полиорганную недостаточность.

Венозная тромбоэмболия (ВТЭ) является более распространенным осложнением у онкологических пациентов по сравнению со здоровыми людьми. ВТЭ ассоциируется с высокой смертностью у пациентов. Несколько факторов, таких как стадия опухоли, неоадьювантная химиотерапия и хирургическое вмешательство, способствуют развитию ВТЭ у пациентов. Раковые клетки проявляют прокоагулянтную активность в отношении своего микроокружения, что связано с активацией системы свертывания крови. По мере изучения молекулярного механизма, лежащего в основе прокоагулянтной активности опухолей у пациентов, выявляют молекулярные мишени, связанные с ВТЭ, что может помочь в разработке соответствующей терапии, которая может улучшить клинические исходы у этих пациентов. Недавнее исследование показало, что праймирование метастатических клеток рака поджелудочной железы тромбоцитами стимулирует нейтрофилы к высвобождению внеклеточных ловушек, что способствует тромбозу. Тромбоциты, полученные из ткани опухоли рака желудка, могут стимулировать нейтрофилы к высвобождению ловушек. Нейтрофильные ловушки усиливают прокоагулянтную активность, что положительно коррелирует с экспрессией тромбин–антитромбина (ТАТ) и повышению уровня D-димера в сыворотке крови. Исследования как на людях, так и на животных показывают, что усиление тромбоза может быть результатом увеличения количества активированных тромбоцитов. Тем не менее, мало что известно о взаимодействии между нейтрофильными ловушками и активацией тромбоцитов у пациентов с ГК. Повреждение венозных эндотелиальных клеток у онкологических больных также тесно связано с венозным тромбозом. Цитотоксичность нейтрофильных ловушек в отношении эндотелиальных клеток усиливает прокоагулянтную активность при плоскоклеточном раке полости рта, даже у пациентов с механической желтухой и воспалительными заболеваниями кишечника. В недавнем исследовании Li J.C. и соавт. (2022) при раке желудка была показана зависимость выраженности маркеров нетоза и стадии заболевания: уровни свободной бесклеточной ДНК,

комплексов цитрулинированных гистонов с ДНК, МПО-ДНК нарастали тем выше, чем позднее была стадия рака. В этой работе авторы наглядно продемонстрировали, что совместная инкубация опухолевых клеток и нейтрофилов здоровых людей запускает нетоз, и даже супернатанты опухолевых клеток обладали подобным действием. Совместное культивирование тромбоцитов здоровых людей с нейтрофильными ловушками приводило к активации тромбоцитов, что проявлялось усилением адгезии тромбоцитов. Внесение активированных ловушками тромбоцитов в плазму здоровых людей приводило к повышению образования фибрина и ТАГ-комплекса (рис. 16).⁶⁶

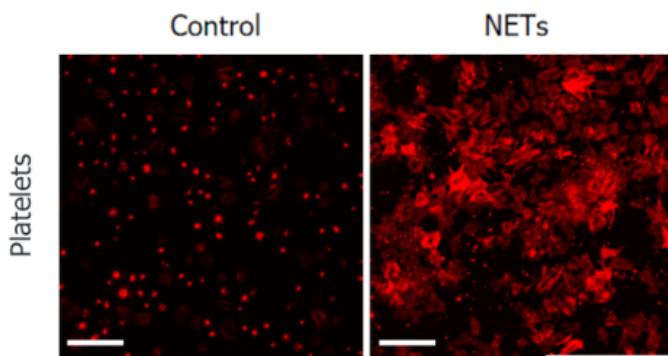


Рис. 16. Активация тромбоцитов в присутствии нейтрофильных ловушек. Красным – окрашивание антителами на компонент цитоскелета F-актин

Установлена взаимосвязь нейтрофильных ловушек с повреждением эндотелиальных клеток и тромбообразованием. В исследовании S. Ну и соавт. (2020) изучали прокоагулянтную роль нейтрофильных ловушек у пациентов с ишемическим инсультом, вызванном тромбозом сонной артерии. В местах повреждения сонной артерии было повышено содержание нейтрофильных ловушек, активированных тромбоцитов и их микрочастиц. На ловушках в тромбах и в плазме пациентов с инсультом обнаружен фосфатидилсерин, запускающий каскад свер-

⁶⁶ Li JC, Zou XM, Yang SF, Jin JQ, Zhu L, Li CJ, Yang H, Zhang AG, Zhao TQ, Chen CY. Neutrophil extracellular traps participate in the development of cancer-associated thrombosis in patients with gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2022 Jul 14;28(26):3132-3149. doi: 10.3748/wjg.v28.i26.3132. PMID: 36051331; PMCID: PMC9331535.

тывания. Фосфатидилсерин ловушек служил каркасом для отложения факторов свертывания и микрочастиц тромбоцитов. Ингибиторы нетоза и фосфатидилсерина снижали тромбообразование. Плазма из образцов, полученных из сонной артерии, вызывала нетоз с экспрессией фосфатидилсерина на нейтрофилах здоровых людей. Ловушки за счет своих протеаз оказывали токсическое действие на эндотелий сосудов, переводили в прокоагулянтный статус, а также запускали экспрессию TF на эндотелии. После внесения нейтрофильных ловушек в культуру эндотелиальных клеток наблюдали как на эндотелиальных клетках колокализуются факторы свертывания (FVa, Fxa), между нарушенными контактами эндотелия появляются нити фибрина⁶⁷.

Хотя патогенез артериального и венозного тромбоза различен, в обоих этих процессах принимают участие NETs. При венозном тромбозе активированный эндотелий высвобождает фактор фон Виллебранда и P-селектин, которые привлекают тромбоциты и нейтрофилы. Во время активации тромбоциты индуцируют нейтрофилы, и те высвобождают внеклеточные ловушки, которые становятся каркасом для построения тромба и адгезии тромбоцитов. NETs способствует расщеплению ингибитора тканевого фактора и стимуляции Ха фактора.

NETs также играют значимую роль в образовании атеросклеротических бляшек, которые могут привести к артериальному тромбозу. При контакте нейтрофилов с кристаллами холестерина может спонтанно запускаться нетоз, который приводит к задержке тромбоцитов, активации коагуляции и образованию артериальных тромбов.

⁶⁷ Zhou P, Li T, Jin J, Liu Y, Li B, Sun Q, Tian J, Zhao H, Liu Z, Ma S, Zhang S, Novakovic VA, Shi J, Hu S. Interactions between neutrophil extracellular traps and activated platelets enhance procoagulant activity in acute stroke patients with ICA occlusion. *EBioMedicine*. 2020 Mar;53:102671. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102671. Epub 2020 Feb 27. PMID: 32114386; PMCID: PMC7047181.

РАЗДЕЛ 10. МЕТОДЫ ДЕТЕКЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ЛОВУШЕК

Протоколы получения нейтрофильных ловушек и последующего их окрашивания антителами и флюоресцентными красителями для конфокальной микроскопии доступны в широком круге научных публикаций. Приводим здесь описание метода от А. Neumann и соавт. (2014). Для индукции образования внеклеточных ловушек нейтрофилы стимулировали 25 нМ РМА и инкубировали в течение 4 ч при 37°C, 5% и CO₂. Клетки фиксировали с помощью 4% параформальдегида, далее ловушки можно визуализировать. Фиксированные клетки промывали 3 раза PBS, пермеабелизировали и блокировали 2% BSA в 0,2% Triton X-100/PBS в течение 45 мин при комнатной температуре. Далее инкубировали с мышиными моноклональными антителами к компонентам ловушек (в указанной работе использовали антитела к комплексу гистонов с ДНК – анти-H2A-H2B-ДНК), 0,5 мкг/мл в 2% BSA в 0,2% Triton X-100/PBS). Инкубацию с антителами проводили в течение ночи при 4°C с последующим промыванием (3 раза PBS) и последующей инкубацией с меченым Al e α -Fluor-488 козым антителом против мыши в течение 45 мин при комнатной температуре. После промывки предметные стекла монтировали в среду ProlongGold® anti fade с DAPI (Invitrogen) и анализировали методом конфокальной флуоресцентной микроскопии с использованием микроскопа Leica TCS SP5 с иммерсионным масляным объективом HCX PL APO 40 \times 0,75–1,25. Настройки были скорректированы на контрольных препаратах с использованием контрольных изотипических антител. Для каждого препарата были получены три случайно выбранных изображения, которые использовались для количественной оценки образования нейтрофильных ловушек. Данные были выражены в виде площади, покрытой ловушками. Для статистического анализа использовали среднее значение, полученное по 6 изображениям для каждого условия в эксперименте⁶⁸.

⁶⁸ Neumann A, Völlger L, Berends ET, Molhoek EM, Stapels DA, Midon M, Friães A, Pingoud A, Rooijackers SH, Gallo RL, Mörgelin M, Nizet V, Naim HY, von Köckritz-Blickwede M. Novel role of the antimicrobial peptide LL-37 in the protection of neutrophil extracellular traps against degradation by bacterial nucleases. *J Innate Immun.* 2014;6(6):860-8. doi: 10.1159/000363699. Epub 2014 Jul 8. PMID: 25012862; PMCID: PMC4201878.

В работе Tohme и соавт. (2016) получали нейтрофильные ловушки с помощью клеточного сортера. Нейтрофилы выделяли из костного мозга, на сортере получали очищенную фракцию. Предварительно нейтрофилы выдержали в покрытой плашке 1 час в CO₂-инкубаторе при 37 град. С. Далее проводили активацию нейтрофилов с помощью 4-часового инкубирования в плашке с форбол-12-мирикат-13-ацетатом (PMA, 100nM, Sigma-Aldrich) при 37 град. С в CO₂-инкубаторе. Затем проводили иммунофлуоресцентный ана-

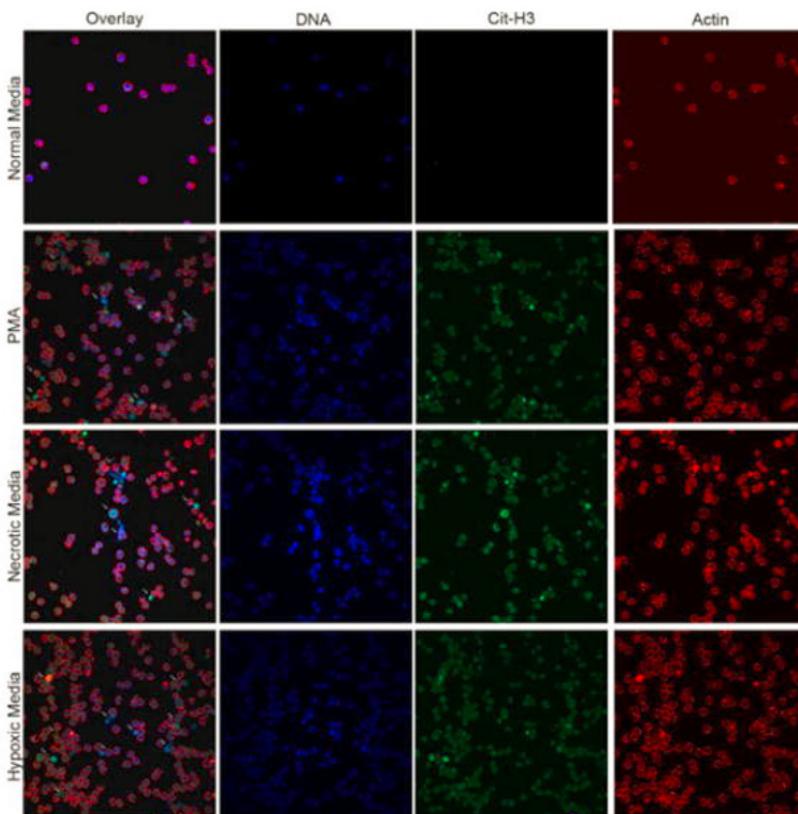


Рис. 17. Изображения на конфокальном микроскопе при окрашивании антителами против ДНК (голубой), cit-H3 гистонов (зеленый) и актина (красный) Стрелки слева на совмещенном изображении указывают на ловушки. Tohme и соавт. (2016)

лиз с антителами против ДНК, цитруллированных гистонов и актина, совмещали изображения на конфокальном микроскопе (рис. 17)⁶⁹.

Визуализация нейтрофильных ловушек более показательна при окрашивании клеток с помощью флуоресцентных красителей и антител с флуоресцентной меткой. Наиболее часто используют краситель для нуклеиновых кислот DAPI, дающий голубую окраску. Флуоресцентно-мечеными антителами окрашивают компоненты нейтрофильных ловушек: нейтрофильная эластаза, цитрулинированные гистоны citH3, комплексы гистонов с ДНК, комплексы МПО с ДНК и другие.

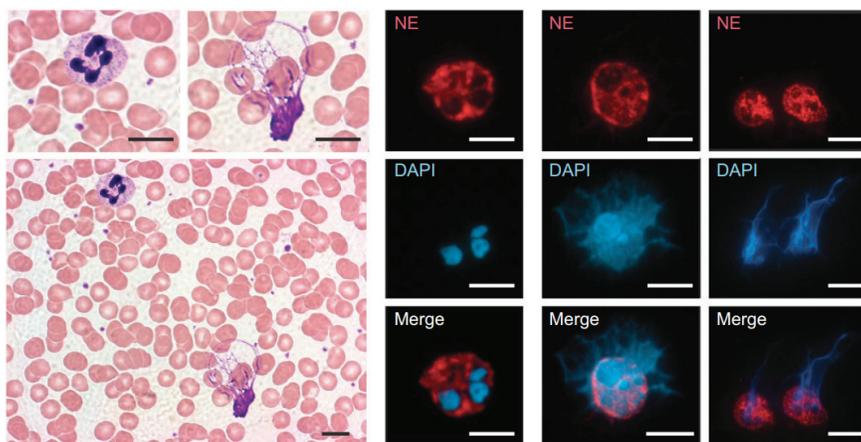


Рис. 18. Обнаружение нейтрофильных ловушек методом световой микроскопии (слева) и флуоресцентной конфокальной микроскопии (справа). DAPI – окраска на ДНК (голубой), NE – окраска на нейтрофильную эластазу (красный)⁷⁰

⁶⁹ Tohme S, Yazdani HO, Al-Khafaji AB, Chidi AP, Loughran P, Mowen K, et al. Neutrophil extracellular traps promote the development and regression of liver metastases after surgical stress. *Cancer Res.* (2016) 76:1367–80. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1591

⁷⁰ Beiter T, Fragasso A, Hudemann J, Schild M, Steinacker J, Mooren FC, Niess AM. Neutrophils release extracellular DNA traps in response to exercise. *J Appl Physiol* (1985). 2014 Aug 1;117(3):325-33. doi: 10.1152/jappphysiol.00173.2014. Epub 2014 May 15. PMID: 24833781.

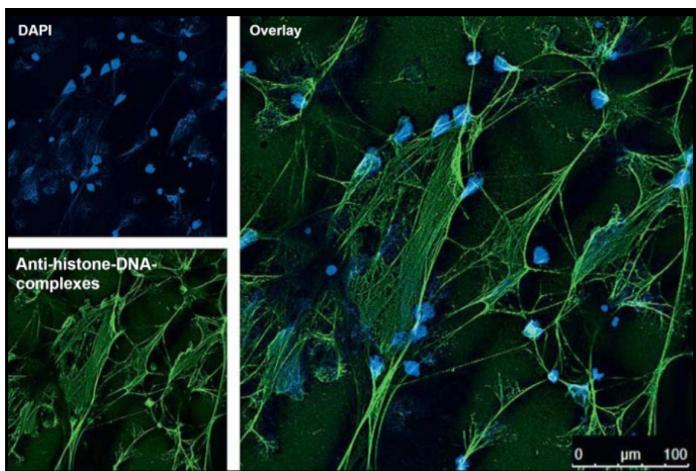


Рис. 19. Обнаружение нейтрофильных ловушек, конфокальная флюоресцентная микроскопия. Ловушки визуализированы с применением Alexa 488-меченных антител против комплексов гистонов с ДНК H2A-H2B-ДНК (зеленый) и DAPI для окрашивания ДНК в голубой. Справа совмещенное изображение⁷¹.

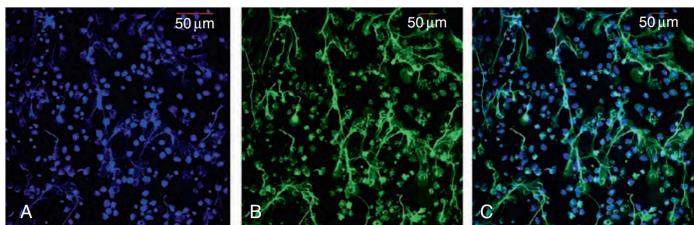


Рис. 20. Обнаружение нейтрофильных ловушек, конфокальная флюоресцентная микроскопия. Ловушки визуализированы с применением Alexa 488-меченных антител против МПО, и DAPI для окрашивания ДНК в голубой. Справа совмещенное изображение⁷²

⁷¹ Neumann A, Völlger L, Berends ET, Molhoek EM, Stapels DA, Midon M, Friães A, Pingoud A, Rooijackers SH, Gallo RL, Mörgelin M, Nizet V, Naim HY, von Köckritz-Blickwede M. Novel role of the antimicrobial peptide LL-37 in the protection of neutrophil extracellular traps against degradation by bacterial nucleases. *J Innate Immun.* 2014;6(6):860-8. doi: 10.1159/000363699. Epub 2014 Jul 8. PMID: 25012862; PMCID: PMC4201878.

⁷² M. von Köckritz-Blickwede, O. Chow, M. Ghochani, and V.Nizet, "Visualization and functional evaluation of phagocyte extracellular traps," *Methods in Microbiology C*, vol. 37, pp. 139–160, 2010

В дополнение к качественной визуализации, высвобождение нейтрофильных ловушек также может быть определено количественно. Наиболее распространенные методы включают количественное определение площади, покрытой внеклеточной ДНК после окрашивания, флуоресцентную спектроскопию питательных сред после добавления ДНК-связывающих красителей или модифицированный ИФА против комплексов МРО-ДНК или NE-ДНК, характерных для ловушек. Совсем недавно было опубликовано сообщение о новом методе количественной оценки с использованием многоспектральной проточной цитофлуорометрии и стали доступны алгоритмы автоматической количественной оценки флуоресцентных изображений⁷³.

Циркулирующие нуклеосомы из нейтрофильных ловушек можно обнаружить методом ИФА против компонентов нейтрофильных ловушек – комплексов МПО-ДНК⁷⁴, ⁷⁵ и ДНК-связывающего белка HMGB1, поскольку эти вещества обнаруживали в супернатантах стимулированных нейтрофилов (Tohme и соавт. (2016).

Обнаружить связь нейтрофильных ловушек с опухолевыми клетками можно с помощью детекции на поверхности клеток интегринов $\alpha 5\beta 1$, $\alpha \nu\beta 3$, and $\alpha \nu\beta 5$ ⁷⁶, через эти интегрин в экспериментальной модели опухолевые клетки прикреплялись к нейтрофильным ловушкам.

⁷³ Tong M, Abrahams VM. Visualization and Quantification of Neutrophil Extracellular Traps. *Methods Mol Biol.* 2021;2255:87-95. doi: 10.1007/978-1-0716-1162-3_9. PMID: 34033097; PMCID: PMC8221071.

⁷⁴ Huang H, Tohme S, Al-Khafaji AB, Tai S, Loughran P, Chen L, et al. DAMPs-activated neutrophil extracellular trap exacerbates sterile inflammatory liver injury. *Hepatology.* 2015 Apr 8;

⁷⁵ Kessenbrock K, Krumbholz M, Schonermarck U, Back W, Gross WL, Werb Z, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nature medicine.* 2009 Jun;15(6):623–5

⁷⁶ Monti M, De Rosa V, Iommelli F, Carriero MV, Terlizzi C, Camerlingo R, et al. Neutrophil extracellular traps as an adhesion substrate for different tumor cells expressing RGD-binding integrins. *Int J Mol Sci.* (2018) 19:2350. doi: 10.3390/ijms19082350

РАЗДЕЛ 11. ПОДХОДЫ К ФАРМАКОТЕРАПИИ, НАПРАВЛЕННЫЕ НА НЕЙТРОФИЛЬНЫЕ ЛОВУШКИ

В настоящее время уже найдены молекулы, которые способны противодействовать образованию нейтрофильных ловушек нейтрофилами [65, 66]. Более того, учитывая участие нейтрофилов в свертывании крови, имеет смысл оценить активность нейтрофилов и формирование ловушек у пациентов с врожденной (например, гемофилия А) или приобретенной (например, синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания) коагулопатией.

Таким образом, по мнению ряда исследователей, разработка новых терапевтических стратегий, направленных на нейтрофилы, таких как ингибирование рекрутирования нейтрофилов или формирования нейтрофильных ловушек, может снизить уровень тромбозов и смертности у пациентов с COVID-19, а также сердечно-сосудистых осложнений, вызванных другими патогенами⁷⁷.

Терапевтические стратегии, направленные на внеклеточные нейтрофильные ловушки, в первую очередь нацелены на ДНК компонент, ДНКаза является наиболее частым методом лечения. Лечение ДНКазой уменьшало количество ловушек, уменьшало повреждение легких и повышало выживаемость на мышинной модели пневмонии (135). Хлор-амидин, ингибитор PAD4, не оказывал влияния на уровень комплексов нейтрофил-ДНК или степень воспаления легких в модели пневмонии у мышей, но обнаружено, что хлорамидин предотвращал цитруллинирование H3, образование нейтрофильных ловушек и улучшал выживаемость в мышинной модели *cpr*-индуцированного полимикробного сепсиса. Аналогичным образом, мыши PAD4^{-/-} продемонстрировали уменьшение воспаления и повреждения легких в модели пневмонии. Однако эти преимущества были компенсированы

⁷⁷ Sabbatini M, Magnelli V, Renò F. NETosis in Wound Healing: When Enough Is Enough. *Cells*. 2021 Feb 25;10(3):494. doi: 10.3390/cells10030494. PMID: 33668924; PMCID: PMC7996535

повышенной бактериальной нагрузкой и усилением системного воспаления. Мышь с частичным дефицитом PAD4 (PAD4+/-) продемонстрировала улучшенную кривую выживаемости. Эти результаты подтверждают идею о том, что существует тонкая грань для количества нетоза, необходимого как для предотвращения повреждения легких, так и для поддержания микробного контроля.

Хлорохин также был эффективен в качестве раннего ингибитора на ранних стадиях формирования нейтрофильных ловушек, уменьшал нетоз и связанную с ним гиперкоагуляцию и улучшают выживаемость на мышинных моделях аденокарциномы поджелудочной железы и острого панкреатита.

Активированный белок C (APC) представляет собой многофункциональную протеазу, обладающую противовоспалительными, антикоагулянтными и цитопротекторными свойствами. Недавнее исследование продемонстрировало, что APC связывает человеческие лейкоциты и предотвращает индуцирование нетоза с помощью супернатанта тромбоцитов или ФМА. Кроме того, они обнаружили, что предварительная обработка нейтрофилов APC перед индукцией нетоза ингибировала адгезию тромбоцитов к нейтрофильным ловушкам. Однако следует отметить, что активированный белок C не оказал никакого влияния на выживаемость в крупномасштабных клинических испытаниях на людях у пациентов с тяжелым сепсисом. Было продемонстрировано, что антитела, нейтрализующие сывороточный цитруллинированный гистон 3, могут улучшить выживаемость в мышинной модели экспериментального сепсиса. Эти исследования демонстрируют, что прекращение избыточного образования тромбов может привести к благоприятным исходам при сепсисе.

Ранние ингибиторы внеклеточных нейтрофильных ловушек, такие как хлорохин, ингибиторы PAD4и APC, специально предназначены для контроля формирования ловушек. Напротив, ингибиторы нетоза на поздних стадиях, такие как ДНКаза и антигистоновые антитела, могут воздействовать на внеклеточную ДНК или гистоны независимо от их источника. Эти молекулы также рассматриваются как DAMPs и могут высвобождаться рядом иммунных клеток в дополнение к их высвобождению из нейтрофилов. Следовательно, мо-

леулы/лекарственные средства, которые специфически контролируют образование внеклеточных ловушек, могут быть использованы в качестве более специфического терапевтического режима против нетоза⁷⁸.

⁷⁸ Denning NL, Aziz M, Gurien SD, Wang P. DAMPs and NETs in Sepsis. *Front Immunol.* 2019 Oct 30;10:2536. doi: 10.3389/fimmu.2019.02536. PMID: 31736963; PMCID: PMC6831555.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Перечислите основные функции нейтрофильных гранулоцитов
2. Какие стадии можно выделить в классическом нетозе?
3. Каким образом открытие внеклеточных нейтрофильных гранулоцитов повлияло на понимание роли нейтрофильных гранулоцитов в организме?
4. Какова роль нейтрофилов во взаимосвязи воспаления и тромбообразования?
5. Какова роль нейтрофильных ловушек в тромбообразовании?
6. Какие компоненты внеклеточных нейтрофильных внеклеточных могут быть потенциальными биомаркерами?
7. Перспективы потенциальных терапевтических подходов открываются в свете новых данных о нейтрофильных ловушках и нетозе
8. Роль нейтрофильных ловушек при инфекции COVID-19

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Фрейдлин И.С. Иммунная система и ее дефекты: Руководство для врачей. СПб., 1998. – 113 с. – ISBN 5-230-08852-4.
2. Edwards, S. (1994). Contents. In *Biochemistry and Physiology of the Neutrophil* (pp. V-Xi). Cambridge: Cambridge University Press.
3. Хаитов Р.М. Современные представления о защите организма от инфекции / Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин // *Иммунология*. 2000. – № 1. – С. 61-64.
4. Беляева Анастасия Сергеевна, Ванько Л.В., Матвеева Н.К., Кречетова Л.В. Нейтрофильные гранулоциты как регуляторы иммунитета // *Иммунология*. 2016. №2. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/neytrofilnye-granulotsity-kak-regulyatory-immuniteta> (дата обращения: 25.11.2022).
5. Клетки иммунной системы: учеб.пособие / А.А.Тотолян, И.С.Фрейдлин; Санкт-Петербург: Наука, 2000. Т.1 : Нейтрофилы. – 130 с.
6. Гаранина Е. Е., Мартынова Е. В., Иванов К. Я. и соавт. «Инфлам-масомы: роль в патогенезе заболеваний и терапевтический потенциал» Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки, vol. 162, no. 1, 2020, pp. 80-111
7. Carty M, Guy C, Bowie AG. Detection of Viral Infections by Innate Immunity. *Biochem Pharmacol*. 2021 Jan;183:114316. doi: 10.1016/j.bcrp.2020.114316. Epub 2020 Nov 3. PMID: 33152343.
8. Гаранина Е.Е., Мартынова Е.В., Иванов К.Я. и соавт.» Инфлам-масомы: роль в патогенезе заболеваний и терапевтический потенциал» Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки, vol. 162, no. 1, 2020, pp. 80-111.
9. Солодовникова О. Н., Молочный В. П. «Кислородный взрыв» нейтрофильных лейкоцитов в патогенезе воспалительной реакции при гнойных инфекциях у детей // *Дальневосточный медицинский журнал*. 2012. №1. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/kislorodnyy-vzryv-neytrofilnyh-leykotsitov-v-patogeneze-vospalitelnoy-reaktsii-pri-gnoynyh-infektsiyah-u-detey> (дата обращения: 27.11.2022).

10. Masucci MT, Minopoli M, Del Vecchio S and Carriero MV (2020) The Emerging Role of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Tumor Progression and Metastasis. *Front. Immunol.* 11:1749. doi:10.3389/fimmu.2020.01749

11. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004 Mar 5;303(5663):1532-5. doi: 10.1126/science.1092385. PMID: 15001782.

12. Александр Николаевич Казимирский, Ж. М. Салмаси, Г. В. Порядин. Антивирусная система врожденного иммунитета: патогенез и лечение COVID-19 // Вестник РГМУ. 2020. №5. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/antivirusnaya-sistema-vrozhdennogo-immuniteta-patogenez-i-lechenie-covid-19>

13. Воробьева Н. В. (2020). НЕЙТРОФИЛЬНЫЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ЛОВУШКИ: НОВЫЕ АСПЕКТЫ. Вестник Московского университета. Серия 16. Биология, 75 (4), 210-225.

14. Liu Y, Lightfoot YL, Seto N, Carmona-Rivera C, Moore E, Goel R, O'Neil L, Mistry P, Hoffmann V, Mondal S, Premnath PN, Gribbons K, Dell'Orso S, Jiang K, Thompson PR, Sun HW, Coonrod SA, Kaplan MJ. Peptidylarginine deiminases 2 and 4 modulate innate and adaptive immune responses in TLR-7-dependent lupus. *JCI Insight.* 2018 Dec 6;3(23):e124729. doi: 10.1172/jci.insight.124729. PMID: 30518690; PMCID: PMC6328098

15. Harry Morrison, in *Enzyme Active Sites and their Reaction Mechanisms*, 1st Edition, 2020; ISBN: 9780128210673

16. de Buhr N, von Köckritz-Blickwede M. How Neutrophil Extracellular Traps Become Visible. *J Immunol Res.* 2016;2016:4604713. doi: 10.1155/2016/4604713. Epub 2016 May 16. PMID: 27294157; PMCID: PMC4884809.

17. Mutua V, Gershwin LJ. A Review of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Disease: Potential Anti-NETs Therapeutics. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2021 Oct;61(2):194-211. doi: 10.1007/s12016-020-08804-7. PMID: 32740860; PMCID: PMC7395212.

18. Becker RC. COVID-19 update: Covid-19-associated coagulopathy. *J Thromb Thrombolysis.* 2020 Jul;50(1):54-67. doi: 10.1007/s11239-020-02134-3. PMID: 32415579; PMCID: PMC7225095.

19. Colling ME, Kanthi Y. COVID-19-associated coagulopathy: An exploration of mechanisms. *Vasc Med.* 2020 Oct;25(5):471-478. doi: 10.1177/1358863X20932640. Epub 2020 Jun 19. PMID: 32558620; PMCID: PMC7306998.

20. Sabbatini M, Magnelli V, Renò F. NETosis in Wound Healing: When Enough Is Enough. *Cells.* 2021 Feb 25;10(3):494. doi: 10.3390/cells10030494. PMID: 33668924; PMCID: PMC7996535.

21. Rizo-Téllez SA, Sekheri M, Filep JG. Myeloperoxidase: Regulation of Neutrophil Function and Target for Therapy. *Antioxidants (Basel).* 2022 Nov 21;11(11):2302. doi: 10.3390/antiox11112302. PMID: 36421487; PMCID: PMC9687284.

22. Delgado-Rizo V, Martínez-Guzmán MA, Iñiguez-Gutierrez L et al (2017) Neutrophil extracellular traps and its implications in inflammation: an overview. *Front Immunol* 8:81

23. Hoeksema M, Tripathi S, White M et al (2015) Arginine-rich histones have strong antiviral activity for influenza A viruses. *Innate Immun* 21:736–745. [ht tps://doi.org/10.1177/1753425915593794](https://doi.org/10.1177/1753425915593794)

24. Branzk N, Lubojemska A, Hardison SE et al (2014) Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *NatImmunol* 15:1017–1025. <https://doi.org/10.1038/ni.2987>

25. Плехова Наталья Геннадьевна, Кодрашова Н.М., Гельцер Б.И., Котельников В.Н. Клеточно-молекулярные факторы врожденной защиты и их роль в патогенезе пневмонии // *Иммунология.* 2017. №2. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/kletochno-molekulyarnye-factory-vrozhdennoy-zaschity-i-ih-rol-v-patogeneze-pnevmonii>.

26. Colling ME, Kanthi Y. COVID-19-associated coagulopathy: An exploration of mechanisms. *Vasc Med.* 2020 Oct;25(5):471-478. doi: 10.1177/1358863X20932640. Epub 2020 Jun 19. PMID: 32558620; PMCID: PMC7306998

27. Becker RC. COVID-19 update: Covid-19-associated coagulopathy. *J Thromb Thrombolysis.* 2020 Jul;50(1):54-67. doi: 10.1007/s11239-020-02134-3. PMID: 32415579; PMCID: PMC7225095.

28. Colling ME, Kanthi Y. COVID-19-associated coagulopathy: An exploration of mechanisms. *Vasc Med.* 2020 Oct;25(5):471-478. doi: 10.1177/1358863X20932640. Epub 2020 Jun 19. PMID: 32558620; PMCID: PMC7306998.

29. Александр Николаевич Казимирский, Ж. М. Салмаси, Г. В. Порядин АНТИВИРУСНАЯ СИСТЕМА ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА: ПАТОГЕНЕЗ И ЛЕЧЕНИЕ COVID-19 // Вестник РГМУ. 2020. №5. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/antivirusnaya-sistema-vrozhdennogo-immuniteta-patogenez-i-lechenie-covid-19>

30. Sabbatini M, Magnelli V, Renò F. NETosis in Wound Healing: When Enough Is Enough. *Cells*. 2021 Feb 25;10(3):494. doi: 10.3390/cells10030494. PMID: 33668924; PMCID: PMC7996535

31. Koppe U., Suttorp N., Opitz B. Recognition of Streptococcus pneumoniae by the innate immune system. *Cell. Microbiol.* 2012; 14(4): 460–6. doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01746.x.

32. Witzenrath M., Pache F., Lorenz D., Koppe U., Gutbier B. et al. The NLRP3 inflammasome is differentially activated by pneumolysin variants and contributes to host defense in pneumococcal pneumonia. *J. Immunol.* 2011; 187(1): 434–40. doi: 10.4049/jimmunol.1003143.

33. Li RHL, Tablin F (2018) A comparative review of neutrophil extracellular traps in sepsis. *Front Vet Sci* 5:291

34. Ekaney ML, Otto GP, Sossdorf M et al (2014) Impact of plasma histones in human sepsis and their contribution to cellular injury and inflammation. *Crit Care* 18:543. <https://doi.org/10.1186/s13054-014-0543-8>

35. Denning NL, Aziz M, Gurien SD, Wang P. DAMPs and NETs in Sepsis. *Front Immunol.* 2019 Oct 30;10:2536. doi: 10.3389/fimmu.2019.02536. PMID: 31736963; PMCID: PMC6831555.

36. Hoffmann JHO, Enk AH (2016) Neutrophil extracellular traps in dermatology: caught in the NET. *J Dermatol Sci* 84:3–10

37. Pinegin B, Vorobjeva N, Pinegin V (2015) Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 14:633–640

38. Pan L, Lu MP, Wang JH et al (2020) Immunological pathogenesis and treatment of systemic lupus erythematosus. *World J Pediatr* 16:19–30

39. Hidalgo AI, Carretta MD, Alarcón P et al (2019) Proinflammatory mediators and neutrophils are increased in synovial fluid from heifers with acute ruminal acidosis. *BMC Vet Res* 15:1–10. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1974-x>

40. Apel F, Zychlinsky A, Kenny EF (2018) The role of neutrophil extracellular traps in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 14:467–475

41. Wigerblad G, KaplanMJ (2020) NETs spread ever wider in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 16:73–74

42. Berezin A (2019) Neutrophil extracellular traps: the core player in vascular complications of diabetes mellitus. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev* 13:3017–3023

43. Nakazawa D, Tomaru U, Yamamoto C et al (2012) Abundant neutrophil extracellular traps in thrombus of patient with microscopic polyangiitis. *FrontImmunol* 3. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00333>

44. Sabbatini M, Magnelli V, Renò F. NETosis in Wound Healing: When Enough Is Enough. *Cells*. 2021 Feb 25;10(3):494. doi: 10.3390/cells10030494. PMID: 33668924; PMCID: PMC7996535

45. Рамеев В. В., Козловская Л. В. Аутовоспалительные заболевания: общее понятие, механизмы развития, клиническая картина, подходы к лечению // *Нефрология*. 2012. №2. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/autovospalitelnye-zabolevaniya-obschee-ponyatie-mehanizmu-razvitiya-klinicheskaya-kartina-podhody-k-lecheniyu> (дата обращения: 21.11.2022).

46. Desai J, Steiger S, Anders HJ (2017) Molecular pathophysiology of gout. *Trends Mol Med*

47. Homa-Mlak I, Majdan A, Mlak R, Małeczka-Massalska T. Metastatic potential of NET in neoplastic disease. *Postepy Hig Med Dosw.* (2016) 70:887–95. doi: 10.5604/17322693.1216275

48. Monti M, De Rosa V, Iommelli F, Carriero MV, Terlizzi C, Camerlingo R, et al. Neutrophil extracellular traps as an adhesion substrate for different tumor cells expressing RGD-binding integrins. *Int J Mol Sci.* (2018) 19:2350. doi: 10.3390/ijms19082350

49. Kanamaru R, Ohzawa H, Miyato H, Yamaguchi H, Hosoya Y, Lefor AK, et al. Neutrophil extracellular traps generated by low density neutrophils obtained from peritoneal lavage fluid mediate tumor cell growth and attachment. *J Vis Exp.* (2018) 138:58201. doi: 10.3791/58201

50. Gonzalez-Aparicio M, Alfaro C. Influence of interleukin-8 and neutrophil extracellular trap (NET) formation in the tumor microenvironment: is there a pathogenic role? *J Immunol Res.* (2019) 2019:6252138. doi: 10.1155/2019/6252138

51. Avalos BR, Gasson JC, Hedvat C, Quan SG, Baldwin GC, Weisbart RH, et al. Human granulocyte colony-stimulating factor: biologic activities

and receptor characterization on hematopoietic cells and small cell lung cancer cell lines. *Blood*. (1990) 75:851–7

52. Snoderly HT, Boone BA, Bennewitz MF. Neutrophil extracellular traps in breast cancer and beyond: current perspectives on NET stimuli, thrombosis and metastasis, and clinical utility for diagnosis and treatment. *Breast Cancer Res*. (2019) 21:145. doi: 10.1186/s13058-019-1237-6

53. Cedervall J, Zhang Y, Huang H, Zhang L, Femel J, Dimberg A, et al. Neutrophil extracellular traps accumulate in peripheral blood vessels and compromise organ function in tumor-bearing animals. *Cancer Res*. (2015) 75:2653–62. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3299

54. Boone BA, Murthy P, Miller-Ocuin J, Doerfler WR, Ellis JT, Liang X, et al. Chloroquine reduces hypercoagulability in pancreatic cancer through inhibition of neutrophil extracellular traps. *BMC Cancer*. (2018) 18:678. doi: 10.1186/s12885-018-4584-2

55. Richardson JJR, Hendrickse C, Gao-Smith F, Thickett DR. Neutrophil extracellular trap production in patients with colorectal cancer in vitro. *Int J Inflam*. (2017) 2017:4915062. doi: 10.1155/2017/4915062

56. Tohme S, Yazdani HO, Al-Khafaji AB, Chidi AP, Loughran P, Mowen K, et al. Neutrophil extracellular traps promote the development and progression of liver metastases after surgical stress. *Cancer Res*. (2016) 76:1367–80. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1591

57. Thålin C, Lundström S, Seignez C, Daleskog M, Lundström A, Henriksson P, et al. Citrullinated histone H3 as a novel prognostic blood marker in patients with advanced cancer. *PLoS ONE*. (2018) 13:e0191231. doi: 10.1371/journal.pone.0191231

58. Li JC, Zou XM, Yang SF, Jin JQ, Zhu L, Li CJ, Yang H, Zhang AG, Zhao TQ, Chen CY. Neutrophil extracellular traps participate in the development of cancer-associated thrombosis in patients with gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2022 Jul 14;28(26):3132-3149. doi: 10.3748/wjg.v28.i26.3132. PMID: 36051331; PMCID: PMC9331535.

59. Бицадзе В.О., Слуханчук Е.В., Хизроева Д.Х., Третьякова М.В., Шкода А.С., Радецкая Л.С., Макацария А.Д., Элалами И., Грис Ж.-К., Грандоне Э. Внеклеточные ловушки нейтрофилов (NETs) в патогенезе тромбоза и тромбовоспалительных заболеваний. *Вестник РАМН*. 2021;76(1):75–85. doi:<https://doi.org/10.15690/vramn1395>

60. Engelman B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector

of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013 Jan;13(1):34-45. doi: 10.1038/nri3345. Epub 2012 Dec 7. PMID: 23222502.

61. Ito T. PAMPs and DAMPs as triggers for DIC. *J Intensive Care.* 2014 Dec 31;2(1):67. doi: 10.1186/s40560-014-0065-0. PMID: 25705424; PMCID: PMC4336279.

62. Knight JS, Kanthi Y. Mechanisms of immunothrombosis and vasculopathy in antiphospholipid syndrome. *Semin Immunopathol.* 2022 May;44(3):347-362. doi: 10.1007/s00281-022-00916-w. Epub 2022 Feb 4. PMID: 35122116; PMCID: PMC8816310.

63. Ito T. PAMPs and DAMPs as triggers for DIC. *J Intensive Care.* 2014 Dec 31;2(1):67. doi: 10.1186/s40560-014-0065-0. PMID: 25705424; PMCID: PMC4336279.

64. Li JC, Zou XM, Yang SF, Jin JQ, Zhu L, Li CJ, Yang H, Zhang AG, Zhao TQ, Chen CY. Neutrophil extracellular traps participate in the development of cancer-associated thrombosis in patients with gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2022 Jul 14;28(26):3132-3149. doi: 10.3748/wjg.v28.i26.3132. PMID: 36051331; PMCID: PMC9331535.

65. Zhou P, Li T, Jin J, Liu Y, Li B, Sun Q, Tian J, Zhao H, Liu Z, Ma S, Zhang S, Novakovic VA, Shi J, Hu S. Interactions between neutrophil extracellular traps and activated platelets enhance procoagulant activity in acute stroke patients with ICA occlusion. *EBioMedicine.* 2020 Mar;53:102671. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102671. Epub 2020 Feb 27. PMID: 32114386; PMCID: PMC7047181.

66. Neumann A, Völlger L, Berends ET, Molhoek EM, Stapels DA, Midon M, Friães A, Pingoud A, Rooijackers SH, Gallo RL, Mörgelin M, Nizet V, Naim HY, von Köckritz-Blickwede M. Novel role of the antimicrobial peptide LL-37 in the protection of neutrophil extracellular traps against degradation by bacterial nucleases. *J Innate Immun.* 2014;6(6):860-8. doi: 10.1159/000363699. Epub 2014 Jul 8. PMID: 25012862; PMCID: PMC4201878.

67. Tohme S, Yazdani HO, Al-Khafaji AB, Chidi AP, Loughran P, Mowen K, et al. Neutrophil extracellular traps promote the development and progression of liver metastases after surgical stress. *Cancer Res.* (2016) 76:1367–80. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1591

68. Beiter T, Fragasso A, Hudemann J, Schild M, Steinacker J, Mooren FC, Niess AM. Neutrophils release extracellular DNA traps in response to

exercise. *J Appl Physiol* (1985). 2014 Aug 1;117(3):325-33. doi: 10.1152/jappphysiol.00173.2014. Epub 2014 May 15. PMID: 24833781.

69. Neumann A, Völlger L, Berends ET, Molhoek EM, Stapels DA, Midon M, Friães A, Pingoud A, Rooijackers SH, Gallo RL, Mörgelin M, Nizet V, Naim HY, von Köckritz-Blickwede M. Novel role of the antimicrobial peptide LL-37 in the protection of neutrophil extracellular traps against degradation by bacterial nucleases. *J Innate Immun*. 2014;6(6):860-8. doi: 10.1159/000363699. Epub 2014 Jul 8. PMID: 25012862; PMCID: PMC4201878.

70. M. von Köckritz-Blickwede, O. Chow, M. Ghochani, and V.Nizet, «Visualization and functional evaluation of phagocyte extracellular traps,» *Methods in Microbiology C*, vol. 37, pp. 139–160, 2010

71. Tong M, Abrahams VM. Visualization and Quantification of Neutrophil Extracellular Traps. *Methods Mol Biol*. 2021;2255:87-95. doi: 10.1007/978-1-0716-1162-3_9. PMID: 34033097; PMCID: PMC8221071.

72. Huang H, Tohme S, Al-Khafaji AB, Tai S, Loughran P, Chen L, et al. DAMPs-activated neutrophil extracellular trap exacerbates sterile inflammatory liver injury. *Hepatology*. 2015 Apr 8;

73. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schonermarck U, Back W, Gross WL, Werb Z, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nature medicine*. 2009 Jun;15(6):623–5

74. Monti M, De Rosa V, Iommelli F, Carriero MV, Terlizzi C, Camerlingo R, et al. Neutrophil extracellular traps as an adhesion substrate for different tumor cells expressing RGD-binding integrins. *Int J Mol Sci*. (2018) 19:2350. doi: 10.3390/ijms19082350

75. Sabbatini M, Magnelli V, Renò F. NETosis in Wound Healing: When Enough Is Enough. *Cells*. 2021 Feb 25;10(3):494. doi: 10.3390/cells10030494. PMID: 33668924; PMCID: PMC7996535

76. Denning NL, Aziz M, Gurien SD, Wang P. DAMPs and NETs in Sepsis. *Front Immunol*. 2019 Oct 30;10:2536. doi: 10.3389/fimmu.2019.02536. PMID: 31736963; PMCID: PMC6831555.

Учебное издание

Воробьева Надежда Александровна
Кисина Татьяна Евгеньевна

**НЕЙТРОФИЛЬНЫЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ
ЛОВУШКИ: МЕХАНИЗМ ОБРАЗОВАНИЯ
И ФУНКЦИИ, РОЛЬ В ВОСПАЛЕНИИ**

Учебное пособие

Издано в авторской редакции

Компьютерная верстка *Г.Е. Волковой*

Подписано в печать 23.05.2023.
Формат 60×84^{1/16}. Бумага офсетная.
Гарнитура Times New Roman. Печать цифровая.
Усл. печ. л. 3,1. Уч.-изд. л. 4,4.
Тираж 100 экз. Заказ № 2571

ФГБОУ ВО «Северный государственный медицинский университет»
163069, г. Архангельск, пр. Троицкий, 51
Телефон (8182) 20-61-90. E-mail: izdatelnsmu@yandex.ru

