

УДК: 619:616.9/615.371

DOI:10.52419/issn2072-2419.2023.4.37

РОЛЬ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ И КАТИОННЫХ БЕЛКОВ В КАЧЕСТВЕ БИОМАРКЕРОВ ТЯЖЕСТИ ТЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИОННЫХ И НЕИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЖИВОТНЫХ

Пименов Н.В.* – д-р биол. наук, проф. кафедры иммунологии и биотехнологии, (ORCID: 0000-0003-1658-1949); **Лаптев С.В.** – канд. биол. наук, доц. кафедры иммунологии и биотехнологии, (ORCID: 0000-0002-3023-6976); **Пермякова К.Ю.** – ст. препод. кафедры иммунологии и биотехнологии (ORCID: 0000-0002-3579-4416); **Марзанова С.Н.** – канд. биол. наук, доц. кафедры иммунологии и биотехнологии, (ORCID: 0000-0001-9895-8046); **Иванникова Р.Ф.** – канд. биол. наук, доцент кафедры физиологии, фармакологии и токсикологии, (ORCID: 0000-0002-3522-0447).

ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина»

*pimenov-nikolai@yandex.ru

Ключевые слова: иммунитет, нейтрофилы, макрофаги, фагоцитоз, катионные белки, сепсис.

Key words: immunity, neutrophils, macrophages, phagocytosis, cationic proteins, sepsis.

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-26-00091, <https://rscf.ru/project/22-26-00091>

Поступила: 05.10.2023

Принята к публикации: 17.11.2023

Опубликована онлайн: 08.12.2023



РЕФЕРАТ

Определяющую роль в первичной реакции организма на микробные агенты играет врожденный иммунитет. Он реализуется посредством активации клеточных и гуморальных факторов неспеци-

фической резистентности – нейтрофилов, макрофагов и секретируемых ими антимикробных и регуляторных веществ, запускающих, в свою очередь, каскад реакций с участием лимфоцитов. На поверхности слизистых оболочек и в мукозальных секретах нейтрофилы реализуют свою функцию не только посредством фагоцитоза, но и за счет выброса ДНК и бактерицидных гранул, образующих нейтрофильные внеклеточные ловушки. Нарушение функционирования этих клеток на поверхности слизистых оболочек рассматривается как один из факторов формирования патологических микробных сообществ, приводящих к развитию дисбиозов и воспаления различной локализации. Завершенный характер фагоцитоза обеспечивают микробицидные системы лейкоцитов: катионные белки и миелопероксидаза. Они имеют особое иммунологическое значение и оказывают влияние на течение и исход заболевания. Миелопероксидаза и катионные белки являются основными факторами бактерицидной защиты.

Зеркалом функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов служит цитоплазматическая зернистость. При интоксикации гранулы нейтрофилов становятся более крупными, чем в норме, а септический процесс может сопровождаться вакуолизацией цитоплазмы [16].

Развитие воспалительно-гнойных заболеваний и сепсиса сопровождается возрастанием в крови больных животных количества нейтрофилов с незначительным содержанием гранул или даже с гомогенной цитоплазмой, что является признаком глубокой депрессии функциональных возможностей системы нейтрофильных гранулоцитов. Существует обширный список заболеваний и патологических процессов у животных, при которых происходит повреждение врожденных барьеров организма, которые в норме предотвращают проникновение бактерий и их компонентов. Присутствие бактерий или их компонентов (септицемия/эндотоксемия) в циркуляторном русле вызывает иммунологический ответ, который, в конечном счете, приводит к экспрессии генов, обеспечивающих трансляцию и высвобождение белков острой фазы и цитокинов. Эти процессы приводят к критической дисфункции сердечно-сосудистой системы, активации комплемента, недостаточности органов и смерти [6].

Катионные белки образуются в гранулоцитах и хранятся в их гранулах. Они несут значительный положительный заряд на поверхности белковой мицеллы (отсюда их название – катионные белки). Изучение структурных, антимикробных, цитотоксических и механистических свойств катионных белков гранулоцитов расширяет знания, необходимые для разработки этих пептидов в качестве биомаркеров тяжести течения инфекционных заболеваний и новых терапевтических альтернатив антибиотикам [15].

Эффекты катионных белков:

- Высокая неспецифическая бактерицидная активность.

- Во время воспалительного процесса катионные белки могут высвободиться

во внеклеточную среду и участвовать в реабсорбции иммунных комплексов и нейтрализации бактерий и вирусов, локализованных во внеклеточной среде, тем самым дополнительно высвобождая миелопероксидазу из нейтрофильных гранулоцитов. Это приводит к внутриклеточному снижению содержания катионных белков и миелопероксидазы.

- Повышенная проницаемость стенок микрососудов (катионные белки действуют как сигнал для высвобождения гистамина).

- Усиление эмиграции лейкоцитов.

- Активизация контакта нейтрофилов и макрофагов с микробами и другими объектами фагоцитоза.

Катионные белки в малых концентрациях стимулируют, а в больших – подавляют основные биохимические процессы в клетках очага воспаления, что дает основание отнести катионные белки к медиаторам воспаления.

Во время воспалительного процесса они могут высвободиться во внеклеточную среду и участвовать в реабсорбции иммунных комплексов и нейтрализации бактерий и вирусов, локализованных во внеклеточной среде, тем самым дополнительно высвобождая миелопероксидазу из нейтрофильных гранулоцитов. Это приводит к внутриклеточному снижению содержания катионных белков и миелопероксидазы [9; 2]. Так, у здоровых телят из экологически благополучных районов (ЭБР) содержание катионных белков в нейтрофильных гранулоцитах было выше ($1,34 \pm 0,16$), чем у здоровых телят ($1,05 \pm 0,02$) из экологически неблагополучных районов (ЭНР), что достоверно свидетельствует о функциональной противомикробной системе нейтрофилов у новорожденных телят. Содержание катионных белков в нейтрофильных гранулоцитах у новорожденных телят из ЭНР со среднетяжелой формой колибактериоза в остром периоде составила ($0,81 \pm 0,07$), что на 23,9% ниже, чем у здоровых телят в тех же хозяйствах ($1,05 \pm 0,02$). У больных телят из хозяйств ЭБР содержание катионного белка составило ($0,98 \pm 0,20$). В

период выздоровления содержание катионного белка увеличивалось в среднем на 17%, разница показателя была достоверной ($P < 0,05$) [8].

В качестве индикатора активности нейтрофилов миелопероксидаза может служить маркером интенсивности воспалительного процесса [18]. У собак при II, III и IV степени хронической почечной недостаточности (ХПН) установили низкие значения среднего цитохимического показателя (СЦК) катионных белков. Так, СЦК у здоровых животных был $0,99 \pm 0,09$; у особей с I степенью ХПН – $1,05 \pm 0,07$ (то есть он входил в интервал референтных значений $0,90 - 1,08$ для здоровых особей по данной выборке); со II степенью ХПН – $0,63 \pm 0,07$; с III степенью ХПН – $0,30 \pm 0,13$ и с IV степенью ХПН – $0,15 \pm 0,05$. Снижение СЦК в третьей – пятой группах относительно первой составляло соответственно 36,4 % ($p < 0,01$), 69,7 % ($p < 0,01$), и 84,9 % ($p < 0,001$) [4]. Это свидетельствует о снижении активности лизосомальных катионных белков пропорционально степени почечной недостаточности. Эффективность действия антимикробных пептидов зависит, в том числе и от их концентрации, поэтому постоянное снижение среднего цитохимического показателя катионных белков в нейтрофильных гранулоцитах у собак с хронической почечной недостаточностью приводит к ослаблению защиты против широкого спектра микроорганизмов (грамотрицательных и грамположительных бактерий, грибов, вирусов).

У инфицированного молодняка крупного рогатого скота до годовалого возраста выявлена однонаправленная трансформация, характеризующаяся снижением числа неактивных клеток на 28,5-45,0%, увеличением количества нейтрофильных гранулоцитов с высокой степенью активности антимикробных пептидов на 16,4-41,5% [3]. С полуторагодового возраста наблюдается противоположная траектория изменений, характеризующаяся снижением катионных белков и миелопероксидазы на 29,8 и 18,1% соответственно.

Так, у цыплят в первой декаде жизни отмечался рост содержания моноцитов – до 348,84% ($p < 0,05$). Со второй декады отмечалось уменьшение индексов соотношения гранулоцитов с дегранулированными и декатионизированными лизосомальными гранулами катионных белков. Этот период отличался активным расходом катионных белков. При относительном сохранении расходования катионных белков с третьей на четвертую декаду, средний цитохимический коэффициент (СЦК) уменьшался на 25,29%. Кроме того, происходило активное восстановление паритета концентрации катионных белков, что является одним из звеньев восстановления и поддержания гомеостаза неспецифического иммунитета.

В ответ на бактериальную инфекцию как псевдотуберкулезную, так и листериозную показатели активности катионных белков были отрицательными и их динамика носила волнообразный характер. Это свидетельствовало о дегрануляции клетками катионных белков при их взаимодействии с бактериями [17].

В ответ на внутрибрюшинное заражение животных *Y. pseudotuberculosis* при нарастающем повышении активности МП до $193,96 \pm 2,33\%$ ($p < 0,01$) (19 ч после заражения) отмечалось снижение показателей суммарной активности ферментов дыхательной цепи в НСТ-тесте; через 7 ч после заражения *L. monocytogenes* выявлено достоверное повышение показателей НСТ-теста до $43,39 \pm 2,06\%$ ($p < 0,05$). Исследование активности ферментов нейтрофильных гранулоцитов, принимающих участие в преобразовании молекул кислорода, показало различную интенсивность респираторного метаболизма этих клеток в ответ на заражение *Y. pseudotuberculosis* и *L. monocytogenes*. Необходимо отметить отличие в активности изученных ферментов нейтрофилов в зависимости от их принадлежности к системному кровотоку или месту воспаления (перитонийный экссудат) в использованных моделях исследования *in vitro* или *in vivo*. Это объясняется состоянием «праймированности» нейтрофилов места

воспаления, согласно которому эти клетки, покидая кровоток, достигают активированного состояния с повышенным уровнем протекания процессов их метаболизма. Поэтому при дополнительной стимуляции (заражении бактериями) у таких нейтрофилов по сравнению с клетками крови обнаруживается снижение внутриклеточного содержания ферментов и катионных белков [2].

В настоящее время воспалительные и иммунные реакции рассматриваются в неразрывном единстве. Нейтрофилы действуют как первая линия иммунной защиты [41; 37] и представляют собой уникальную мультипотентную популяцию клеток иммунной системы, которые относятся к врожденному иммунитету и могут активировать и регулировать адаптивный иммунитет. Различные рецепторы селективных, интегринов, хемотрактантов, хемокинов, компонентов комплемента, эндотоксинов, цитокинов, гормонов, нейропептидов, рецепторов распознавания образов, рецепторов индукции апоптоза и т.д. расположены на поверхности нейтрофилов. Сохранение пула рецепторов происходит в нейтрофильном гранулярном аппарате.

Рецепторы, необходимые в данный момент, перемещаются по поверхностной мембране под воздействием различных активаторов [13]. Нейтрофилы отвечают респираторным взрывом на различные антигенные воздействия. Они обладают наибольшей способностью генерировать активные формы кислорода и хлора, осуществляя кислород-зависимый киллинг микробов. Кислороднезависимая бактерицидная система нейтрофилов включает катионных белков, ферменты, лактоферрин и другие субстанции гранул нейтрофилов [61].

Уникальным механизмом противомикробной защиты является формирование нейтрофильных экстрацеллюлярных сетей (нейтрофильных внеклеточных ловушек, NET). Сети образуются и реализуют свое действие (внеклеточный киллинг микроорганизмов) в момент активной смерти нейтрофила, называемой NETosis.

Образование сетей является контролируемым процессом и его можно рассматривать как альтернативу фагоцитозу. Наиболее важными отличиями нетоза от апоптоза и некроза являются распад ядерной оболочки и смешивание ядерного и цитоплазматического материала, потеря внутренней мембраны и исчезновение цитоплазматических органелл [10].

Описан механизм, так называемого, быстрого или прижизненного нетоза (vital NETosis), который запускается под влиянием микробов через 5-30 мин. после активации нейтрофила. Клетка лишается ядра, но сохраняет способность двигаться и фагоцитировать [53]. Высокоактивная смесь, попав во внеклеточное пространство, формирует сеть-«ловушку» (НВЛ), в которую и попадают бактерии. Нейтрофил при этом погибает [20].

Ловушка представляет из себя трёхмерную сеть в межклеточном пространстве. Её остов формирует ДНК, на нити которой адсорбированы гистоны и белки гранул нейтрофилов: микробицидные ферменты, антибактериальные катионные белки, нейтральные сериновые протеазы, металлопротеиназы, кислые гидролазы, продукты респираторного взрыва – перекись водорода, гидроксильный радикал, галогены, атомарный кислород, оксид азота, пероксинитрит и другие, в том числе и миелопероксидаза

Важен баланс между образованием и разрушением нейтрофильных внеклеточных ловушек. Так, нарушение их образования приводит к тяжелым гнойно-септическим процессам. Избыточное образование НВЛ показано при аутоиммунных заболеваниях, бронхиальной астме, респираторном дистресс синдроме, преэклампсии, тромбозе [32; 31; 39].

Нейтрофильные экстрацеллюлярные сети нейтрофильных гранулоцитов – уникальный механизм противомикробной защиты [5]. Осуществляя внеклеточный киллинг микроорганизмов, нейтрофильные гранулоциты погибают через NET [52]. При экстрацеллюлярной дегрануляции при образовании NET продукты гранул, «залипая» в сетях ядерной или мито-

хондриальной ДНК, выстрелившей из нейтрофильных гранулоцитов, осуществляют внеклеточный киллинг микроорганизмов. Формирование NET – финальный шаг программы активной клеточной смерти: NET образуются и реализуют свои действия в момент активной смерти нейтрофильных гранулоцитов. NET формируются путем сложных морфологических перестроек в ядре клетки [28].

Сетевые структуры появляются после дезинтеграции ядерной оболочки и гранулярных мембран. Морфология цитоплазмы и органелл остается неизменной и интактной, нет фрагментации ДНК и фосфатидилсерин не экспонируется перед клеточной смертью. Во время формирования NET не наблюдается активации каспаз, необходимых для запуска клеточной смерти через апоптоз. Клеточная смерть, возникающая в процессе формирования NET. Она зависит от наработки активных форм кислорода через активацию NADPH-оксидазы нейтрофильных гранулоцитов [28]. Хемокиновый рецептор опосредует образование NET, а блокада CXCR2-рецептора молекулами антагонистов приводит к подавлению образования NET, что коррелирует с благоприятным клиническим состоянием и свидетельствует об их патогенетической значимости [44].

Микробы, иммунные комплексы, аутоантитела, цитокины и другие стимулы могут индуцировать NETosis [38]. Разнообразие белков NET зависит от стимула, который вызывает NETosis [29].

Факторы вирулентности бактерий могут оказывать нейтрализующие влияния на активность NET, например ДНКазы бактерий, вызывают деградацию ДНК NET. Описаны врожденные дефекты формирования NET при хронической гранулематозной болезни [33]. Также, дефектное формирование NET может быть причиной развития тяжелой гнойно-септической патологии [27]. Феномен формирования NET выявлен при некоторых патологических состояниях: стрептококковых инфекциях, пневмококковой пневмонии и при сепсисе [57].

Широкое разнообразие патогенов

(бактерии, грибы, простейшие, паразиты и даже вирусы) может вызвать образование NET и быть убитыми НГ. В дополнение к позитивной роли NET (внеклеточный киллинг микроорганизмов: вирусов, бактерий, грибов) показаны их негативные эффекты при некоторых иммунозависимых заболеваниях. Так, NET принимает активное участие в развитии аутоиммунного воспаления. Активация оси тромбоциты-НГ приводит к возникновению NET и формированию тромбов, в том числе при сепсисе. Установлено участие NET в повреждении тканей. NET могут разрушить кишечные эпителиальные клетки, эндотелий, особенно при сепсисе [55].

Другой побочный эффект NET – это гиперактивация системы коагуляции, наблюдаемая при сепсисе (синдром внутрисосудистого свертывания) [28]. Исход воспаления сопровождается замещением нейтрофилов в очаге воспаления моноцитами. На поздних этапах в очаге воспаления преобладают апоптотические нейтрофилы, которые вызывают дифференцировку макрофагов в M2 (IL-10high, IL12low) [22].

Исход воспаления зависит от ликвидации этиологического фактора, удаления некротических клеток, накопления апоптотических клеток, появления иммунных комплексов, аннексина-1, смены цитокинов Th1 (ИЛ-1 β , ФНО, ИНФ- γ) на цитокины Th2 (ИЛ-4, ИЛ-6), секреции ИЛ-10, TGF- β , синтеза резолвинов, протектинов, маресинов. Макрофаги завершают острое воспаление, активируя процессы пролиферации и регенерации и инициируют формирование приобретенного иммунитета. При сохранении источника DAMPs формируется хроническое воспаление [35].

Первая линия защиты организма от инфекции включает фагоцитоз при участии лизоцима, катионных белков и гидролитических ферментов. Катионных белки нейтрофилов являются модуляторами воспалительных реакций организма при сепсисе, который характеризуется присутствием микроорганизмов и их ток-

синов в крови. Выявлено достоверное повышение нейтрофильных гранулоцитов с различной степенью содержания в них гранул катионных белков, выраженной в виде среднего цитохимического коэффициента. При этом отмечено отсутствие маркерной динамики в клинико-гематологических показателях при гнойно-септических послеродовых осложнениях у коров, что определило прогностическую ценность теста на катионные белки. Генерализация бактериозов приводит в дальнейшем к снижению среднего цитохимического индекса катионных белков нейтрофилов, что свидетельствует о неблагоприятном прогнозе развития инфекционно-воспалительного процесса.

Количество гранул нейтрофильных гранулоцитов и интенсивность окраски позволяет судить о состоянии кислород-зависимой биоксидной системы нейтрофилов. Мощный рецепторный состав обеспечивает связь между собой и клетками иммунной системы, с клетками эндотелия, эпителия и других тканей. Активация нейтрофильных гранулоцитов способствуют транслокации из цитоплазматических гранул и везикул молекул на поверхность цитоплазматическую мембрану, секреции про- и противовоспалительных цитокинов, регуляторных белков и т. д. Происходит дифференцировка нейтрофильных гранулоцитов [51], обеспечивающая участие их в процессах внутриклеточной интрафагосомальной дегрануляции, киллинге и элиминации фагоцитированных микроорганизмов, а также во внеклеточной дегрануляции при формировании нейтрофильных экстрацеллюлярных сетей. Нейтрофильные гранулоциты подразделяют на субпопуляции: регуляторные; супрессорные; провоспалительные – инициирующие воспалительную реакцию; воспалительные с позитивным микробицидным потенциалом (антибактериальным, противовирусным, противогрибковым); воспалительные с негативным цитотоксическим потенциалом – «агрессивные»; противовоспалительные – регулирующие регрессию воспаления; противоопухолевые – TAN1;

проопухолевые – TAN2; гибридные, сочетающие свойства НГ и дендритных клеток. Отсутствие адекватного реагирования, гиперактивация или блокада функций НГ приводит к развитию вялотекущих инфекционно-воспалительных заболеваний, не отвечающих на традиционную терапию, аутоиммунных/хронических заболеваний иммунозависимых процессов [12].

Сепсис имеет самые тяжелые последствия и характеризуется высокой летальностью. Это происходит на фоне нарушений функционирования иммунной системы и дефектных нейтрофильных гранулоцитов, что способствует быстрому диссеминированию инфекции и, как следствие – смерти [59; 48].

Описаны три важных нарушения нейтрофильных гранулоцитов, которые способствуют возникновению тяжелого сепсиса и септического шока: нейтропения, сниженная пластичность и запоздалый апоптоз [45].

При сепсисе и синдроме системной воспалительной реакции (ССВР) в циркуляции появляется большое количество незрелых форм нейтрофильных гранулоцитов. Они характеризуются снижением фагоцитарной функциональной активности и нарушением миграционной способности, имеют более длинный жизненный цикл, резистентны к спонтанному апоптозу и могут созревать *ex vivo* [25].

Различные фенотипические профили и уровень оснащенности поверхностными рецепторами связаны с морфологическими особенностями и определяют функциональный потенциал нейтрофильных гранулоцитов – цитокинопродукцию, трансэндотелиальную миграцию, внутриклеточный и внеклеточный киллинг, образование NET [13; 14].

Индущирующие цитокиновые стимулы дифференцируют нейтрофильные гранулоциты в уникальную гибридную популяцию с дуальными фенотипическими и функциональными свойствами, характерными как для нейтрофильных гранулоцитов, так и дендритных клеток, участвующую во врожденной и адаптивной иммун-

ной реакции [46]. Рецепторы гранулоцитов распознают эндогенные молекулы «опасности», через которые происходит активация клетки и включение ее в реакцию воспаления [47].

Инициация апоптоза нейтрофильных гранулоцитов в клинически здоровом организме осуществляется рецепторным путем под влиянием TNF- α , лиганда sTRAIL и IL-4 [23]. Описаны пути сигнала активации, в результате которого запускается синтез цитокина IL-23, индуцирующего образование Th17-клеток [7]. Рецепторы сохраняются внутриклеточно в гранулярном аппарате нейтрофильных гранулоцитов на мембране секреторных везикул, желатиновых и специфических гранул, а под воздействием активаторов транслоцируются на поверхностную мембрану клетки [26].

Благодаря кислородзависимым и кислороднезависимым механизмам, нейтрофильные гранулоциты обеспечивают выполнение микробицидной, цитотоксической и цитолитической функций, инициируя развитие базисной воспалительной реакции. Цитолитический и цитотоксический потенциал сконцентрирован в гранулярном аппарате и секреторных везикулах, которые являются не только хранилищами протеолитических и бактерицидных протеинов до момента их активации и высвобождения либо во внеклеточное пространство при формировании NET, либо в фагоцитарные вакуоли, но и содержат важный резерв мембранных белков, встраивающихся в поверхностную мембрану нейтрофильных гранулоцитов при экзцитозе этих органелл [11].

Существуют три основных типа гранул нейтрофильных гранулоцитов – первичные (азурофильные), вторичные (специфические), третичные (желатиновые) и секреторные везикулы. Нейтрофильные гранулоциты способны отвечать «респираторным взрывом» на различные антигенные воздействия, обладая феноменом внутриклеточной (внутрифагосомальной) и/или трансмембранной (экстрацеллюлярной, посредством экзцитоза) дегрануляции. Продук-

ты гранул, обладая цитолитическим действием, регулируют функционирование как самих нейтрофильных гранулоцитов, так и других клеток по паракринным и аутокринным механизмам [50; 60]. Нейтрофильные гранулоциты обладают высокой способностью осуществлять внутрифагосомальный киллинг бактерий за счет наработки высоких концентраций активных форм кислорода, супероксид-аниона, гидрогенапероксида, хлорноватистой кислоты [58]. Под влиянием разнообразных индуцирующих стимулов нейтрофильный гранулоцит секретирует большой спектр провоспалительных и противовоспалительных цитокинов; иммунорегуляторных цитокинов; колоние-стимулирующих факторов; ангиогенных и фиброгенных факторов, других цитокинов, различных регуляторных белков и т.д. [43; 54].

Понимание механизмов модуляции нейтрофильных гранулоцитов цитокинами и другими регуляторными пептидами позволяет глубже познать то, как они могут влиять на патофизиологические процессы [30; 55]. Так, нейтрофильные гранулоциты способны к транскрипционно-зависимому синтезу конститутивных и индуцированных белков теплового шока, обладающих выраженными протективными свойствами [1]. Эти клетки могут также повышать экспрессию генов, вовлекаемых в реализацию фагоцитарной функции и отвечать на воздействие провоспалительных цитокинов дифференцировкой с приобретением рецепторов, присущих антигенпрезентирующим клеткам [36; 40; 56].

Длительность жизни нейтрофильных гранулоцитов увеличивается в сайте воспаления, что индуцируется цитокинами микроокружения при их контакте с ЛПС [21]. В противоположность этому, противовоспалительные цитокины, такие как IL-10, ускоряют апоптоз в ЛПС-активированных НГ [34]. IL-17 регулирует гомеостаз нейтрофильных гранулоцитов и влияет на воспаление, ослабляя его в тканях посредством торможения апоптоза гранулоцитов, индуцированного

провоспалительными цитокинами [24].

Глобальные изменения в генной экспрессии нейтрофильных гранулоцитов, возникающие во время рецептор-медиированного фагоцитоза, могут влиять на клетки, позитивно или негативно регулируя процессы апоптоза, а, следовательно, влиять на интенсивность и исход бактериального воспаления [40].

Метод поляризационной микроскопии позволяет эффективно тестировать структурные характеристики ядерного материала нейтрофильных гранулоцитов на разных этапах функционирования клетки. Снижение уровня анизотропии указывает на биологическую активацию хроматина, что является предпосылкой для появления матричной активности ДНК и, возможно, последующего белкового синтеза. Известны две функции хроматина: первая состоит в том, что он в больших количествах входит в состав ДНК; вторая – он используется в качестве оружия для защиты целостности генома [19]. Следует отметить, что АТФ-зависимое ремоделирование хроматина является неотъемлемой частью поддержания константности генома [49]. Показано, что изменения структуры хроматина являются регуляторным механизмом, управляющим транскрипцией генов цитокинов [42]. При бактериальной инфекции происходит «модификации гистонов» и ремоделирование хроматина. Изменения структуры хроматина могут влиять на генную экспрессию в нейтрофильных гранулоцитах [62].

Нейтрофильные гранулоциты имеют три пути для реализации клеточной смерти: некроз, апоптоз и NETosis. В результате некроза, происходит лизис цитоплазматической мембраны и выход содержимого гранулоцитов в окружающие ткани, что приводит к чрезмерной продукции цитокинов, и, нередко, к гиперактивации иммунной системы с развитием локальной и системной воспалительной реакции и повреждением органов и тканей (гнойно-септические заболевания, аутоиммунные и аллергические болезни). Апоптоз играет важную роль в нейтро-

фильном гомеостазе и разрешении воспаления. Гибель нейтрофильных гранулоцитов может провоцироваться воспалительным экстрацеллюлярным микроокружением (провоспалительные цитокины, клеточная адгезия, фагоцитоз, эритроциты, тромбоциты) и приводить к нейтропении, которая осложняет течение сепсиса и других инфекционно-воспалительных заболеваний (ИБЗ) [12].

Апоптоз нейтрофильных гранулоцитов может лимитировать повреждающее действие воспаления при сепсисе. В то же время у пациентов с сепсисом апоптоз обратно пропорционален тяжести сепсиса и может служить маркером тяжести септического процесса. Стресс, в частности хирургический операционный стресс, негативно влияет на FAS-индуцированный апоптоз нейтрофильных гранулоцитов периферической крови, что ассоциировано со значительным снижением уровней сывороточных GM-CSF, IL-6, IL-8 в первый день после операции. При некрозе нарушается целостность самой клетки, она лизируется, но без развития изменений в гранулах и ядерной мембране. Сетеподобная структура, состоящая из молекулы ДНК и содержимого цитоплазматических гранул, при некрозе и апоптозе не образуется [28].

Таким образом, нейтрофильные гранулоциты являются зеркалом гомеостаза. В борьбе с патогенами они проявляют не только внутриклеточную фагоцитарную активность, но и уничтожают их при помощи формирования NET, выброса экстрацеллюлярных везикул. Нейтрофильные гранулоциты способны к синтезу белков *de novo*, то есть обладают белок-синтетической функцией, секретируют большое количество гранулярных ферментных и неферментных белков, обладающих антибактериальными и регуляторными свойствами, цитокинов, хемокинов, регуляторных молекул, ростовых факторов и др. На поверхностной мембране нейтрофильных гранулоцитов экспрессированы сотни различных молекул-рецепторов, обеспечивающих их связь с микроокружением и другими клетками

иммунной системы.

Однако, практически полностью отсутствуют сведения о свойствах, функциях и значении катионных белков гранулоцитов в прогнозировании гнойно-септических патологий в ветеринарной пропедевтике генерализации бактериозов высокоценных племенных сельскохозяйственных животных, что является важным и актуальным для продовольственной безопасности страны и успешного импортозамещения.

Полученные в результате выполнения проекта данные станут основой для разработки рекомендаций, обеспечивающих высокую достоверность в прогнозировании гнойно-септических патологий в ветеринарной пропедевтике генерализации бактериозов.

THE ROLE OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES AND CATIONIC PROTEINS AS BIOMARKERS OF THE SEVERITY OF INFECTIOUS AND NON-INFECTIOUS ANIMAL DISEASES

Pimenov N.V. – Doctor of Biological Sciences, Professor of the Department of Immunology and Biotechnology; **Laptev S.V.** – Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of Immunology and Biotechnology; **Permyakova K.Yu.** – Senior lecturer of the Department of Immunology and Biotechnology; **Mazanov S.N.** – Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of Immunology and Biotechnology; **Ivannikova R.F.** – Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of Physiology, Pharmacology and Toxicology.

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MVA named after K.I. Skryabin»

*pimenov-nikolai@yandex.ru

ABSTRACT

Innate immunity plays a decisive role in the primary reaction of the body to microbial agents. It is realized through the activation of cellular and humoral factors of nonspecific resistance – neutrophils, macrophages and

antimicrobial and regulatory substances secreted by them, which, in turn, trigger a cascade of reactions involving lymphocytes. On the surface of the mucous membranes and in mucosal secretions, neutrophils realize their function not only through phagocytosis, but also through the release of DNA and bactericidal granules that form neutrophil extracellular traps. Violation of the functioning of these cells on the surface of the mucous membranes is considered as one of the factors of the formation of pathological microbial communities, leading to the development of dysbiosis and inflammation of various localization. The completed character of phagocytosis is provided by microbicidal systems of leukocytes: cationic proteins and myeloperoxidase. They have a special immunological significance and influence the course and outcome of the disease. Myeloperoxidase and cationic proteins are the main factors of bactericidal protection.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Бойко А.А., Ветчинин С.С., Сапожников А.М., Коваленко Е.И. Изменение уровня белков теплового шока семейства 70 кДа в нейтрофилах человека под действием теплового шока // Биоорганическая химия. 2014. Т. 40. № 5. – С. 528-540.
2. Вишневский Е.А., Власенко В.С., Алексеева И.Г. Состояние лизосомального катионного белка и активности миелопероксидазы у кроликов, инфицированных ВЛКРС / Актуальные вопросы ветеринарии : Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию кафедры ветеринарной микробиологии, инфекционных и инвазионных болезней факультета ветеринарной медицины ИВМиБ, Омск, 29 июня 2020 года. – Омск: Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина, 2020. – С. 531-535. – EDN ZKH-TUC.
3. Власенко В.С., Вишневский Е.А., Дудолова Т.С. Катионные белки лизосом и миелопероксидаза в нейтрофилах молодняка крупного рогатого скота разного возраста при лейкозной инфекции / Достижения науки и техники АПК. – 2021. –

- Т. 35. № 5. – С. 65-69. – DOI 10.24411/0235-2451-2021-10511.
4. Воронина О.А., Зайцев С.Ю., Брылина В.Е., Белоновская О.С. Оценка активности лизосомальных катионных белков гранулоцитов у животных с хронической почечной недостаточностью // Ветеринария. – 2017. – № 5. – С. 21-24. – EDN YOACNL.
5. Долгушин И.И., Шишков Ю.С., Савочкина А.Ю. Нейтрофильные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов. Москва: РАМН, 2009. 208 с.
6. Каратеев Д.Е., Лучихина Е.Л. Ингибиторы интерлейкина 6 в терапии ревматоидного артрита. Эффективная фармакотерапия. 2022; 18 (8): 16–21. DOI 10.33978/2307-3586-2022-18-8-16-21.
7. Киселева Е.П. Новые представления о противoinфекционном иммунитете // Инфекция и иммунитет. 2011. Т. 1, № 1. – С. 9-14.
8. Ковальчук Н.М. Функциональная активность нейтрофильных гранулоцитов у телят при острых кишечных инфекциях в условиях экологического неблагополучия // Известия Международной академии аграрного образования. – 2018. – № 42-2. – С. 51-54. – EDN YTUJDN
9. Королева О.И., Петрова Г.К., Шакирова Л.З. Прогностическое значение лизосомальных катионных белков оральных нейтрофилов при острой бронхолегочной патологии у подростков // Вопросы современной педиатрии. 2006. Т. 5 (1). – С. 282–283.
10. Коротина О.Л., Генералов И.И. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: механизмы образования, функции // Иммунопатология, Аллергология, Инфектология. – 2012. - №4. – С. 23-32.
11. Кравцов А.Л., Шмелькова Т.П. Секреторная дегрануляция нейтрофилов как триггер воспаления и регулятор иммунного ответа: роль сериновых лейкоцитарных протеаз и протеолитически-активных рецепторов // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2011. № 1. С. 79—87.
12. Нестерова И.В., Н.В. Колесникова, Г.А. Чудилова и др. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм. Часть 2 // Инфекция и иммунитет. – 2018. – Т. 8. № 1. – С. 7–18.
13. Нестерова И.В., Евглевский А.А., Чудилова Г.А. и др. Особенности реструктуризации хроматина и изменение уровня относительной экспрессии генов IL-8, IL-1P и TNF-α нейтрофильных гранулоцитов под влиянием глюкозаминилмурамилдипептида и интерферона у больных хроническим гайморитом в системе *in vitro* // Иммунология. – 2015. – Т. 36. № 6. – С. 363-367.
14. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Клещенко Е.И. и др. Различные варианты дефектов функционирования нейтрофильных гранулоцитов при врожденных пневмониях у новорожденных // Российский иммунологический журнал. – 2012. – Т. 6, № 2. – С. 170-176.
15. Пименов Н.В., Пермякова К.Ю., Марзанова С.Н., Лаптев С.В., Бузмакова Н.А. Катионные белки нейтрофильных гранулоцитов в прогнозировании гнойно-септических послеродовых осложнений у коров // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2023. – № 1 (219). – С. 81–87.
16. Славинский А.А., Критерии функциональной активности нейтрофильных лейкоцитов, основанные на компьютерном анализе изображения и люминесценции. Автореферат диссертации на соискания ученой степени д.б.н. специальность 14.00.29. – Краснодар. 2000. – 38 с.
17. Сомова Л.М., Плехова Н.Г., Дробот Е.И. Реактивность фагоцитирующих клеток при инициации инфекционно-воспалительных процессов // Успехи современной биологии. – 2011. – Т. 131, № 1. – С. 37-49. – EDN NTKQDD.
18. Arnhold J. Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity // Arch Biochem. Biophys. 2010. Vol. 500 (1). P. 92–106. <https://doi.org/10.1201/b16753-6>.
19. Brinkmann V., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? J. Cell Biol, 2012, vol. 198, pp. 773-783. doi: 10.1083/jcb.201203170.
20. Bryan Yipp B. G., Kubes P. NETosis:

- how vital is it? // *Blood*. – 2013. – Vol. 122. – Is.16. – P.2784-2794.
21. Buckley C.D., Ross E.A., McGettrick H.M. et al. Identification of a phenotypically and functionally distinct population of long-lived neutrophils in a model of reverse endothelial migration. *J. Leukoc. Biol.*, 2006 vol. 79, pp. 303-311. doi: 10.1189/jlb.0905496.
22. Cai W., Qin A., Guo P. et al. Clinical significance and functional studies of myeloid-derived suppressor cells in chronic hepatitis C patients // *J. Clin. Immunol.* – 2013. – Vol.33. – P. 798–808.
23. Cassatella M.A. On the production of TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL/Apo-2L) by human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.*, 2006, vol. 79, pp.1140-1149. doi: 10.1189/jlb.1005558.
24. Dragon S., Saffar A.S., Shan L., Gounni A.S. IL-17 attenuates the anti-apoptotic effects of GM-CSF in human neutrophils. *Mol. Immunol.*, 2008, vol. 45, no. 1, pp. 160-168. doi: 10.1016/j.molimm.2007.04.027.
25. Drifte G., Dunn-Siegrist I., Tissières P., Pugin J. Innate immune functions of immature neutrophils in patients with sepsis and severe systemic inflammatory response syndrome. *Crit. Care Med.*, 2013, vol. 41, no. 3, pp. 820–832. doi: 10.1097/CCM.0b013e318274647d.
26. Elghetany M.T. Surface antigen changes during normal neutrophilic development: a critical review. *Blood Cells Mol. Dis.* 2002, vol. 28, no. 2, pp. 260-274.
27. Fadeel B. Babies born without safety NET. *Blood*, 2009, vol. 113, no. 25, pp.6270–6271. doi: 10.1182/blood-2009-03-210328
28. Fuchs T.A., Brill A., Duerschmied D. et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, vol. 107, no. 36, pp. 15880-15885. doi: 10.1073/pnas.1005743107.
29. Garcia-Romo G.S., Caielli S., Vega B. et al. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.*, 2011, vol. 3, pp. 73ra20. doi: 10.1126/scitranslmed.3001201.
30. Gougerot-Pocidalo M.A., El Benna J., Elbim C. et al. Regulation of human neutrophil oxidative burst by pro- and anti-inflammatory cytokines. *J. Soc. Biol.*, 2002, vol. 196, no. 1, pp. 37-46.
31. Guarnotta C, Cappetti B, Casalini P, et al. Neutrophil extracellular traps mediate transfer of cytoplasmic neutrophil antigens to myeloid dendritic cells toward ANCA induction and associated autoimmunity // *Blood*. – 2012. – Vol.120. – P. 3007–3018.
32. Hakkim A, Furnrohr BG, Amann K. et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 2010. – Vol.107. –P. 9813–9818.
33. Heyworth P.G., Cross A.R., Curnutte J.T. Chronic granulomatous disease. *Curr. Opin. Immunol.*, 2003, vol. 15, pp. 578-584.
34. Hofman P. Molecular regulation of neutrophil apoptosis and potential targets for therapeutic strategy against the inflammatory process. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy*, 2004, vol. 3, no. 1, pp. 1-9.
35. Hu X., Li B., Li X. et al. Transmembrane TNF-alpha promotes suppressive activities of myeloid-derived suppressor cells via TNFR// *J. Immunol.* – 2014. – Vol. 192. – P. 1320–1331
36. Iking-Konert C., Wagner C., Deneffle B. et al. Up-regulation of the dendritic cell marker CD83 on polymorphonuclear neutrophils (PMN): divergent expression in acute bacterial infections and chronic inflammatory disease. *Clin. Exp. Immunol.*, 2002, vol. 130, no. 3, pp. 501-508. doi: 10.1046/j.1365-2249.2002.02008.x.
37. Jhunjhunwala S, Aresta-DaSilva S, Tang K. et al. Neutrophil Responses to Sterile Implant Materials // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10. - Is. 9. – P. 65–75.
38. Kaplan M. J., Radic M. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J. Immunol.*, 2012, vol. 189, no. 6, pp.2689-2695. doi: 10.4049/jimmunol.1201719.
39. Kimberly Martinod K., Wagner D.D. Thrombosis: tangled up in NETs// *Blood*. - 2014. – Vol. 123, Is. 18. – P. 2768–2776.
40. Kobayashi S.D., De Leo F.R. Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.*, 2009, vol. 1, no. 3,

- pp. 309-333. doi:10.1002/wsbm.32.
- 41.Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation // *Nat Rev Immunol.* – 2013. – Vol.13. – P. 159–175.
- 42.Li B., Carey M., Workman J.L. The role of chromatin during transcription. *Cell*, 2007, vol. 128, no. 4, pp. 707-719. doi: 10.1016/j.cell.2007.01.015.
- 43.Mantovani A., Cassatella M.C., Costantini C., Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, vol. 11, no. 8, pp. 519-531. doi: 10.1038/nri3024.
- 44.Marcos V., Zou Z., Yildirim A.O. et al. CXCR2 mediates NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation in cystic fibrosis airway inflammation. *Nat Med*, 2010, vol. 16, no. 9, pp. 1018-1023. doi: 10.1038/nm.2209.
- 45.Maródi L. Innate cellular immune responses in newborns. *Clin. Immunol.*, 2006, vol. 118, no. 2–3, pp. 137–144.
- 46.Matsushima H., Geng S., Lu R., Okamoto T. et al. Neutrophil differentiation into a unique hybrid population exhibiting dual phenotype and functionality of neutrophils and dendritic cells. *Blood*, 2013, vol. 121, no. 10, pp. 1677–1689. doi: 10.1182/blood-2012-07-445189.
- 47.Matzinger P. Friendly and dangerous signals: is the tissue control? *Nature Immunol.* 2007, vol. 8, pp. 11-13. doi: 10.1038/ni0107-11.
- 48.McGovern, M., Giannoni, E., Kuester, H. et al. Challenges in developing a consensus definition of neonatal sepsis. *Pediatr Res* 88, 14–26 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41390-020-0785-x>.
- 49.Morrison A.J., Shen X. Chromatin remodelling beyond transcription: the INO80 and SWR1 complexes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2009, no. 10, pp. 373-384. doi: 10.1038/nrm2693.
- 50.Ottonello L., Epstein A.L., Mancini M., Dapino P., Dallegri F. Monoclonal LYM-1 antibody-dependent cytotoxicity by human neutrophils exposed to GM-CSF: auto-regulation of target cell attack by cathepsin G. *J. Leukoc. Biol.*, 2003, vol. 75, no. 1, pp. 99-105. doi: 10.1189/jlb.040313.
- 51.Pillay J., Tak T., Kamp V.M., Koenderman L. Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: similarities and differences. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2013, vol. 70, iss. 20, pp. 3813–3827.
- 52.Remijnsen Q., Kuijpers T.W., Wirawan E. et al. NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell Death Differ.*, 2011, vol. 18, pp. 581-588. doi: 10.1038/cdd.2011.1.
- 53.Rochaël N.C., Guimarães-Costa A.B., T. C. Nascimento M.T.C. Classical ROS-dependent and early/rapid ROS-independent release of Neutrophil Extracellular Traps triggered by Leishmania parasites // *Sci Rep.* – 2015. – Vol. 5. - P.220-233.
- 54.Smuda C., Wechsler J.B., Bruce P.J. TLR-induced activation of neutrophils promotes histamine production via a P13 kinase dependent mechanism. *J. Immunol. Lett.*, 2011, vol. 141, no. 1, pp. 102-108. doi: 10.116/j.imlet.2011.08.002.
- 55.Tamassia N., Cassatella M.A. Cytoplasmic receptors recognizing nucleic acids and mediating immune functions in neutrophils. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2013, vol. 13, no. 4, pp. 547-554. doi: 10.1016/j.coph.2013.05.00.
- 56.Vercauteren D., Pietsch M., Van der Aa L.J. et al. Flotillin-dependent endocytosis and a phagocytosis-like mechanism for cellular internalization of disulfide-based poly (amido amine)/ DNA polyplexes. *Biomaterials*, 2011, vol. 32, no. 11, pp. 3072-3084. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.12.045.
- 57.Wartha F., Beiter K., Albiger B. et al. Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protect Streptococcus pneumoniae against neutrophil extracellular traps. *Cell. Microbiol.*, 2007, vol. 9, no. 5, pp.1162-1171. doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00857.
- 58.Winterbourn C.C., Kettle A.J. Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. *Antioxid. Redox Signal.*, 2013, vol. 18, no. 6, pp. 642-660. doi: 10.1089/ars.2012.4827.
- 59.Wynn J.L., Levy O. Role of innate host defense in susceptibility to early-onset neonatal sepsis. *Clin.Perinatol.*, 2010, vol.37, no.2, pp. 307-337. doi: 10.1016/j.clp.2010.04.001.
- 60.Yang C.W., Strong B.S., Miller M.J., Unanue E.R. Neutrophils influence the level of antigen presentation during the immune response to protein antigens in adjuvants. *J. Immunol.*, 2010, vol. 185, no. 5, pp. 2927-2934. doi: 10.4049/jimmunol.1001289.
- 61.Yoshiro Kobayashi. Neutrophil biology: an update // *EXCLI J.* – 2015. – Vol.14. – P. 220-227.
- 62.Zhang X., Kluger Y., Nakayama Y. et al. Gene expression in mature neutrophils: early responses to inflammatory stimuli. *J. Leukoc. Biol.*, 2004, vol. 75, no. 2, pp. 358–372. doi: 10.1189/jlb.0903412.