

УДК 616-002.1-092:612.112.91.085.2

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2024-4-22-30>

Трансформация нейтрофильных сетей под влиянием патогенов и иммуноглобулинов класса G

Казимирский А.Н., Салмаси Ж.М., Порядин Г.В., Панина М.И., Ким А.Э., Рогожина Л.С.

Российский национальный исследовательский медицинский университет (РНИМУ) им. Н.И. Пирогова
Россия, 117997, г. Москва, ул. Островитянова, 1

РЕЗЮМЕ

Введение. Исследования многих авторов показали, что в периферической крови пациентов с воспалительными заболеваниями присутствуют нейтрофильные экстраклеточные ловушки (НЭЛ, NETs) в морфологической форме нейтрофильных сетей. В наших исследованиях помимо традиционной структуры НЭЛ в виде нейтрофильных сетей были выявлены некоторые аномальные формы, в том числе и вуалеобразные формы НЭЛ.

Цель. Исследование морфофункциональной трансформации НЭЛ под влиянием *Klebsiella pneumoniae* и иммуноглобулинов класса G (IgG).

Материалы и методы. В исследование включены 42 больных 51-й ГКБ г. Москвы: 28 – с острыми воспалительными процессами в брюшной полости (аппендицит, холецистит, панкреатит, перитонит), шесть – с диагнозом «язвенный колит», восемь – с грыжами. Нейтрофилы выделяли, используя градиентное центрифугирование. Для подсчета НЭЛ использовали флуоресцентную микроскопию с красителем SYBR Green (ЗАО «Евроген», Россия), специфично взаимодействующего с двухцепочечной ДНК. Функциональную активность НЭЛ определяли в тесте с захватом *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603).

Результаты. У больных с воспалительными заболеваниями брюшной полости в послеоперационном периоде функциональная активность НЭЛ ослаблена по сравнению со здоровыми в несколько раз. Нейтрофильные экстраклеточные ловушки у этих больных захватывают и связывают не более 20 клеток микроорганизма. Под влиянием IgG нейтрофильные сети превращаются в рыхлые вуалеобразные структуры. Эти нейтрофильные структуры обладают очень слабой способностью к захвату и связыванию патогена, соединяя $8,46 \pm 0,44$ клеток микроорганизма. Спонтанная ферментативная деградация нейтрофильных «вуалей» может сопровождаться продукцией факторов вторичной альтерации.

Заключение. Результаты исследования создают предпосылки для формирования новых подходов к разработке режимов вакцинации и применения иммунобиологических препаратов, требующих предварительного контроля состояния врожденного иммунитета, в частности, нейтрофильных сетей в организме пациентов.

Ключевые слова: нейтрофильные экстраклеточные ловушки, нейтрофильные сети, нейтрофильные вуали, воспаление, функциональная активность НЭЛ, вакцинация, лечение иммунобиологическими препаратами

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Соответствие принципам этики. Все участники исследования подписали информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено этическим комитетом РНИМУ им. Н.И. Пирогова (протокол № 203 от 21.12.2021).

Для цитирования: Казимирский А.Н., Салмаси Ж.М., Порядин Г.В., Панина М.И., Ким А.Э., Рогожина Л.С. Трансформация нейтрофильных сетей под влиянием патогенов и иммуноглобулинов класса G. *Бюллетень сибирской медицины*. 2024;23(4):22–30. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2024-4-22-30>.

Transformation of NETs under the effect of pathogens and IgG

Kazimirskii A.N., Salmasi J.M., Poryadin G.V., Panina M.I., Kim A.E., Rogozhina L.S.

*Pirogov Russian National Research Medical University
1, Ostrovityanova Str., Moscow, 117997, Russian Federation*

ABSTRACT

Background. Many studies have shown that neutrophil extracellular traps (NETs) in the form of web-like structures are present in the peripheral blood of patients with inflammatory diseases. In our research, in addition to traditional web-like NET structures, several anomalous forms were identified, including NETs with cloud-like appearance.

Aim. To investigate morphological and functional transformation of NETs under the influence of *Klebsiella pneumoniae* and immunoglobulin G (IgG).

Materials and methods. The study included 42 patients of Moscow City Clinical Hospital No. 51: 28 patients with acute inflammation in the abdominal cavity (appendicitis, cholecystitis, pancreatitis, peritonitis), 6 patients diagnosed with ulcerative colitis, and 8 patients with hernias. Neutrophils were isolated using gradient-density centrifugation. To calculate NETs, we used SYBR Green I-induced fluorescence microscopy (Evrogen, Russia), with the dye specifically interacting with double-stranded DNA. The functional activity of NETs was determined in the *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) capture test.

Results. In patients with inflammatory diseases of the abdominal cavity in the postoperative period, the functional activity of NETs was several times lower than in healthy individuals. NETs in these patients capture and bind no more than 20 cells of the microorganism. Under the effect of IgG, neutrophil networks transform into loose cloud-like structures, which can hardly capture and bind the pathogen, binding only 8.46 ± 0.44 cells of the microorganism. Spontaneous enzymatic degradation of cloud like NETs may be accompanied by the production of secondary alteration factors.

Conclusion. The results of the study provide the grounds for the development of new approaches to elaborating vaccination regimens and using immunobiologics that require preliminary monitoring of the state of innate immunity, in particular, neutrophil networks in the patient's body.

Keywords: neutrophil extracellular traps, neutrophil web-like structure, neutrophil cloud-like structures, inflammation, NET functional activity, vaccination, immunobiological therapy

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The authors state that they received no funding for the study.

Conformity with the principles of ethics. All study participants signed an informed consent to participate in the study. The study was approved by the Ethics Committee at Pirogov Russian National Research Medical University (Protocol No. 203 of 21.12.2021).

For citation: Kazimirskii A.N., Salmasi J.M., Poryadin G.V., Panina M.I., Kim A.E., Rogozhina L.S. Transformation of NETs under the effect of pathogens and IgG. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2024;23(4):22–30. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2024-4-22-30>.

ВВЕДЕНИЕ

Факторы врожденного иммунитета, в частности нейтрофилы, осуществляют первую линию защиты на пути внедрения различных чужеродных агентов (вирусных, бактериальных и др.) в организм человека. Многочисленные исследования показали, что защитная функция нейтрофилов осуществляется через формирование нейтрофильных экстраклеточных ло-

вушек (НЭЛ, NETs). Образование НЭЛ является эффективным механизмом борьбы с внедряющимися микроорганизмами, а недостаточность формирования НЭЛ или гидролиз основной нуклеотидной цепи НЭЛ бактериальными ДНК-азами делают организм человека восприимчивым к инфекциям [1].

Нейтрофильные экстраклеточные ловушки — это форма реагирования предварительно активированных нейтрофилов на контактные взаимодействия с

клетками макроорганизма, находящимися в состоянии апоптоза, а также различными микроорганизмами, в том числе вирусами [2]. Сигналы к раскрытию НЭЛ нейтрофилы периферической крови получают через различные рецепторы врожденного иммунитета (TLR).

Исследования многих авторов показали, что в периферической крови пациентов с воспалительными заболеваниями присутствуют НЭЛ в морфологической форме нейтрофильных сетей. Однако в наших исследованиях помимо традиционной структуры НЭЛ в виде нейтрофильных сетей были выявлены некоторые аномальные формы, в том числе и вуалеобразные формы НЭЛ [3].

Эти вуалеобразные экстраклеточные структуры, происходящие из нейтрофилов, могут формироваться под действием иммуноглобулинов класса G (IgG) [4]. В отдельных сообщениях также встречаются упоминания о вуалеобразных формах нейтрофильных внеклеточных ловушек, которые находили в крови пациентов с воспалительными заболеваниями и у некоторых здоровых доноров [5, 6]. Однако причины, лежащие в основе формирования различных форм нейтрофильных внеклеточных ловушек, все еще остаются неясными. Не ясна и функциональная роль нейтрофильных экстраклеточных ловушек в морфологических формах сетей и вуалей.

Цель — исследование морфофункциональной трансформации нейтрофильных внеклеточных ловушек под влиянием *Klebsiella pneumoniae* и IgG.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 42 больных, находившихся на лечении в 51-й ГКБ г. Москвы: 28 человек, прооперированных по поводу острых воспалительных процессов в брюшной полости (острый аппендицит, острый холецистит, острый панкреатит/панкреонекроз, перитонит), шесть больных, находящихся на консервативном лечении с диагнозом «язвенный колит», восемь — с пупочной и паховой грыжами (пять неоперированных и трое после оперативного вмешательства).

Исследование проб крови проводили в лаборатории кафедры патофизиологии и клинической патофизиологии Института биологии и патологии человека РНИМУ им. Н.И. Пирогова. Все процедуры выполнялись в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации ВМА (в редакции 2004 г.) и письменного информированного согласия пациентов. Исследование одобрено этическим комитетом РНИМУ им. Н.И. Пирогова (протокол № 203 от 21.12.2021).

Получение клеточных фракций нейтрофилов. Для взятия проб крови использовали вакутайнер с ЭДТА для предотвращения свертывания. Выделение нейтрофилов из венозной крови, обработанной ЭДТА, проводили традиционным методом с помощью градиентного центрифугирования. Чистота выделенной фракции нейтрофилов составляла 98–100%. Нейтрофилы дважды отмывали от примесей фиколла натрий-фосфатным буферным раствором (50 мМ, pH 7,4). Осаждение клеток крови проводили при центрифугировании (600 g, 15 мин). Выделенные нейтрофилы ресуспендировали в среде RPMI-1640 и использовали в экспериментах по кратковременному культивированию. Жизнеспособность выделенных нейтрофилов составляла не менее 95% (тест с 0,1%-м раствором трипанового синего).

Иммунофлуоресцентное определение нейтрофильных экстраклеточных ловушек. Регистрацию нейтрофильных экстраклеточных ловушек проводили с использованием флуоресцентной микроскопии по разработанному нами методу, основные этапы которого описаны ранее [7]. Выявление нейтрофильных экстраклеточных ловушек осуществляли с использованием флуоресцентного красителя SYBR Green (ЗАО «Евроген», Россия), специфично взаимодействующего с двухцепочечной ДНК. Микроскопирование, подсчет и фоторегистрацию клеток и экстраклеточных структур проводили при $\times 1\,000$. Результаты выражали в процентах в виде отношения количества экстраклеточных ловушек к общему числу клеток в поле зрения.

Культивирование нейтрофилов с IgG. К стерильно выделенным клеткам добавляли препарат IgG человека (АО «Сорбент», Россия) и проводили инкубацию с клетками в атмосфере 5%-го CO₂ при 37 °C во всех экспериментах в течение 1 ч. В пробе объемом 100 мкл, приготовленной на среде RPMI-1640, содержались нейтрофилы и препарат IgG (5 мкг/мл). Конечная концентрация клеток в среде культивирования составляла 2×10^5 /мл.

Захват тестового микроорганизма. Определение функциональной активности внеклеточных структур (нейтрофильных сетей) проводили с помощью теста на захват микроорганизма *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603). Для этого к нейтрофилам, иммобилизованным на стекле, покрытом полилизинном, добавляли микробную культуру *Klebsiella pneumoniae* в среде RPMI-1640 в концентрации 10^3 /мкл. Нейтрофильные сети захватывают тестовый микроорганизм в соответствии с потенциальной функциональной активностью НЭЛ. После окрашивания (SYBR Green, 15 мин) и отмывания избытка красителя в ходе микроскопирования определяли морфологическую структуру нейтрофильных экстраклеточных

ловушек и количество клеток *Klebsiella pneumoniae*, связанное каждой экстраклеточной структурой.

Статистическая обработка. Полученные результаты обрабатывали в программе Statistica 12.0 (StatSoft Inc., США). Параметры НЭЛ, полученные при исследовании проб крови больных, обрабатывали методами непараметрической статистики и представляли в виде медианы и интерквартильного размаха $Me [Q_{25}-Q_{75}]$. Сравнение количественных признаков проводили по ранговому *U*-критерию Манна – Уитни и данным дисперсионного анализа Краскела – Уоллиса. Результаты экспериментов по кратковременному культивированию нейтрофилов, характеризующиеся нормальным распределением, представляли в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$), сравнение количественных признаков проводили с применением *t*-теста Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при значениях $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфологическая характеристика НЭЛ у больных с воспалительными заболеваниями брюшной полости. У всех обследованных нами больных с воспалительными заболеваниями брюшной полости в послеоперационном периоде в периферической крови присутствовали НЭЛ в морфологической фор-

ме нейтрофильных сетей. Количество нейтрофильных сетей регистрировалось в диапазоне от 14,2 [7,7–17,9]% при остром аппендиците до 17,6 [10,3–26,6]% при развитии перитонита. Неосложненные нозологические формы абдоминального воспаления в послеоперационном периоде характеризовались сходным количеством НЭЛ в периферической крови. Так, при локальных острых воспалительных процессах относительное количество НЭЛ соответствовало диапазону Me 14,2–15,1%. Разлитое неотграниченное воспаление (перитонит) сопровождалось увеличением численности НЭЛ до уровня Me 17,6% (рис. 1). Таким образом, при распространении воспаления на соседние анатомические области и серозные оболочки брюшной полости (при перитоните) количество нейтрофильных сетей испытывает тенденцию к увеличению ($p = 0,668$).

Определение размеров НЭЛ в микрометрах показало, что у больных с такими воспалительными процессами, как острый холецистит и панкреатит, выявляется статистически значимое ($p = 0,0189$) увеличение размеров нейтрофильных экстраклеточных структур (до 53,65 [43,9–88,45] мкм при остром холецистите и 91,9 [62,0–120,0] мкм – при остром панкреатите) по сравнению с группой больных с диагнозом «острый аппендицит» (44,65 [35,6–57,6] мкм) (рис. 2).

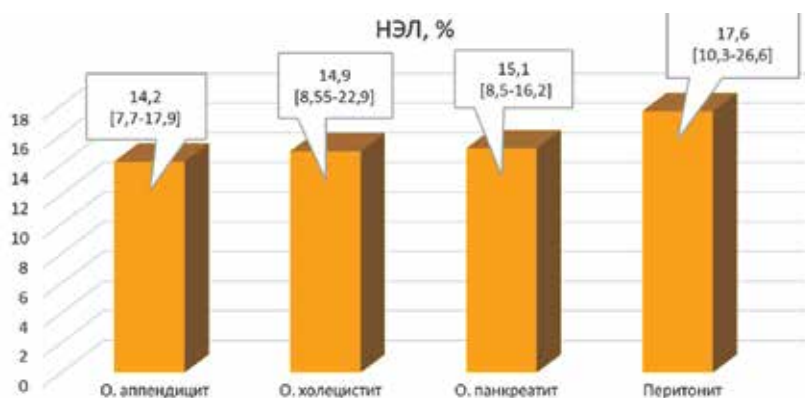


Рис. 1. Количество НЭЛ при воспалительных заболеваниях брюшной полости (послеоперационный период), $Me [Q_{25}-Q_{75}]$, %

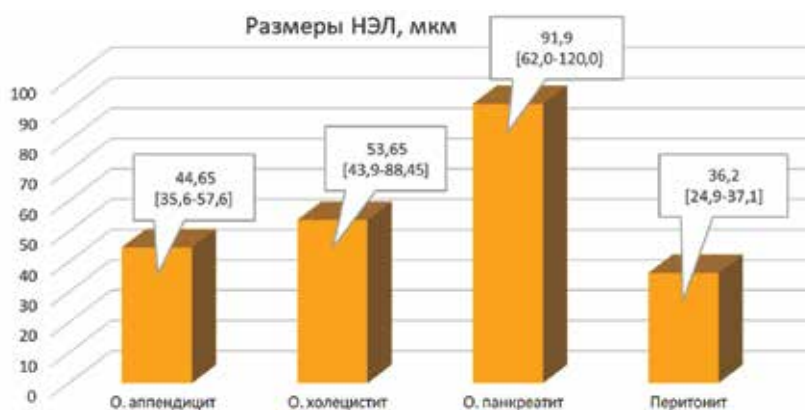


Рис. 2. Размеры НЭЛ при различных воспалительных заболеваниях брюшной полости, $Me [Q_{25}-Q_{75}]$, мкм

При этом, помимо сетевидных структур НЭЛ, у больных были обнаружены дополнительные нейтрофильные структуры – нитевидные, волокнистые и вуалеобразные. Увеличение размеров НЭЛ у пациентов с холециститом и панкреатитом связано именно с присутствием в крови этих необычных, ранее практически не описанных и не исследованных нейтрофильных внеклеточных структур. Наименьшие же размеры НЭЛ были обнаружены у больных язвенным колитом (группа сравнения), получавших консервативное лечение (32,2 [6,3–57,4] мкм).

Исследование морфологической характеристики нейтрофильных экстраклеточных ловушек у больных с воспалительными заболеваниями (рис. 3, 4) поставило перед нами целый ряд важных вопросов, связанных с пониманием процесса функциональной трансформации нейтрофильных внеклеточных структур. Решение вопросов морфофункциональной трансформации нейтрофильных сетей, вероятно, может послужить ключом к пониманию роли тех или иных форм НЭЛ в борьбе с инфекциями и позволит сделать выводы в отношении их функциональной активности.

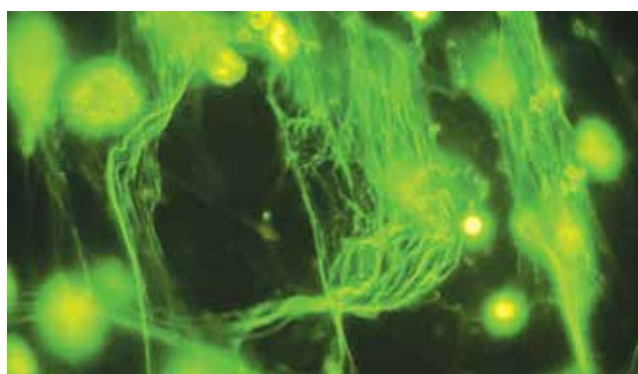


Рис. 3. НЭЛ в морфологической форме нейтрофильных сетей. Сети большого размера. Неосложненный аппендицит после хирургического вмешательства. Пример неосложненного воспалительного процесса с благоприятным течением. Здесь и на рис. 4, 5, 7 время инкубации 1 ч. Окрашивание CYBR Green. $\times 1\,000$

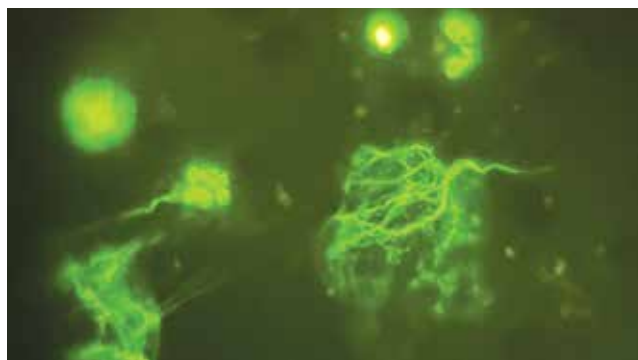


Рис. 4. НЭЛ в морфологической форме нейтрофильных сетей. Язвенный колит (консервативное лечение). Небольшие размеры нейтрофильных сетей

Функциональная характеристика НЭЛ у здоровых доноров и больных с воспалительными заболеваниями брюшной полости. Для исследования роли НЭЛ в противомикробной защите организма и их функциональной активности нами разработан методический подход, при котором НЭЛ, полученные от обследуемых пациентов, *in vitro* приводили во взаимодействие с клетками тестового микроорганизма *Klebsiella pneumoniae* (АТСС 700603). В процессе взаимодействия нейтрофилов с клетками патогена реализуется защитный потенциал клеток врожденного иммунитета.

Здоровые доноры. Нейтрофилы здоровых доноров обладают высокой функциональной активностью [3]. Контактные взаимодействия с клетками *Klebsiella pneumoniae* вызывают формирование НЭЛ в форме нейтрофильных сетей, захват и связывание большого количества клеток тестового микроорганизма (рис. 5). В ходе этого процесса развивается ректракция волокон нейтрофильной сети и происходит ее преобразование в вуалеобразную структуру. Диапазон связывания клеток патогена НЭЛ здоровых доноров составляет 70–90 клеток на одну «вуаль». Каждая НЭЛ в наших экспериментальных условиях захватывает и удерживает в среднем $78,05 \pm 10,58$ клеток *Klebsiella pneumoniae*. При этом практически все клетки тестового микроорганизма локализованы внутри нейтрофильных внеклеточных структур.

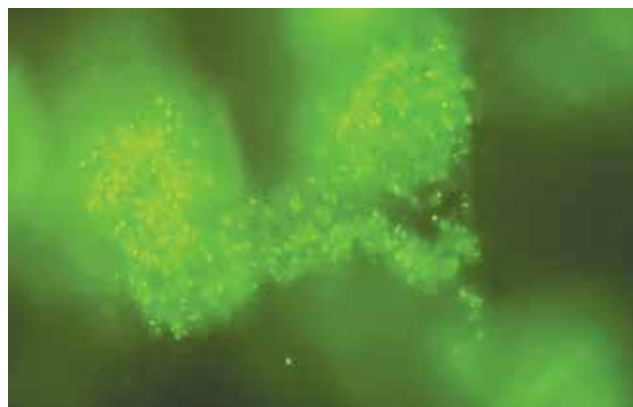


Рис. 5. НЭЛ здоровых доноров захватывают и связывают большое количество клеток *Klebsiella pneumoniae* (АТСС 700603) и приобретают вуалеобразную форму

Больные с воспалительными заболеваниями брюшной полости. У больных с воспалительными заболеваниями брюшной полости (аппендицит, холецистит, панкреатит) в послеоперационном периоде функциональная активность НЭЛ ослаблена по сравнению со здоровыми донорами в несколько раз. Нейтрофильные внеклеточные структуры у этих больных захватывают и связывают в среднем не более 20 кле-

ток тестового микроорганизма. Часть клеток тестового микроорганизма остается несвязанной внеклеточными нейтрофильными структурами, что может создать вероятность развития послеоперационного инфекционного осложнения у этих больных [8].

Динамика изменения функциональной активности НЭЛ в морфологической форме нейтрофильных сетей. Динамику изменения функциональной активности НЭЛ (захват и связывание патогена) у больных в ходе формирования нейтрофильных экстраклеточных структур в форме нейтрофильных сетей исследовали на группе больных с пупочными и паховыми грыжами. У больных с неущемленными неоперированными грыжами количество клеток патогена, захваченное *in vitro* одной внеклеточной нейтрофильной структурой, изменяется от $4,62 \pm 0,36$ до $26,56 \pm 3,45$ через 1 и 2 ч культивирования соответственно, т.е. увеличивается в ходе культивирования в 5,8 раза.

У прооперированных больных по поводу ущемленных грыж захват патогена уже через 1 ч культивирования достигает $38,17 \pm 3,74$ клеток *Klebsiella pneumoniae* на одну внеклеточную нейтрофильную структуру, а через 2 ч культивирования составляет $25,85 \pm 3,20$ клеток патогена на одну НЭЛ. Причина резкого увеличения уровня захвата и связывания патогена внеклеточными нейтрофильными структурами у прооперированных больных уже через 1 ч культивирования состоит, видимо, в том, что в реакции *in vitro*-взаимодействия нейтрофилов прооперированных больных и клеток патогена участвуют уже предварительно *in vivo*-активированные в ходе воспалительного процесса нейтрофилы.

Последующее снижение функциональной активности НЭЛ у прооперированных больных в течение второго часа культивирования может быть связано с тем, что часть первоначально сформированных нейтрофильных внеклеточных структур в форме нейтрофильных сетей вместе с клетками патогена через 1 ч культивирования превращается в рыхлые вуалеобразные нейтрофильные внеклеточные структуры, которые поглощаются нейтрофилами, способными развивать фагоцитарную активность.

Этот эффект – уменьшение количества НЭЛ после их формирования – был исследован и довольно подробно описан в работах других исследователей *in vivo* и *in vitro* [9]. Проведенные исследования выявили зависимость элиминации образованных НЭЛ как от фагоцитирующей активности нейтрофилов и макрофагов [10, 11], так и от ферментативной активности панкреатической ДНК-азы I [12, 13]. Получены данные о том, что провоспалительные цитокины стимулируют фагоцитоз и ускоряют разрушение НЭЛ макрофагами и дендритными клетками [14].

А у больных с тяжелыми бактериальными инфекциями сосудистые окклюзии были вызваны нарушением элиминации НЭЛ *ex vivo*, которые сопровождались формированием внутрисосудистых тромбов, содержащих НЭЛ [15].

Функциональная характеристика НЭЛ у больных с воспалительными заболеваниями брюшной полости под влиянием IgG. Нейтрофильные экстраклеточные ловушки в морфологической форме нейтрофильных сетей очень чувствительны к IgG. Нейтрофильные сети под влиянием IgG превращаются в рыхлые вуалеобразные структуры (рис. 6), при этом их размеры увеличиваются [4], а способность к захвату и связыванию патогена резко ухудшается (рис. 8).

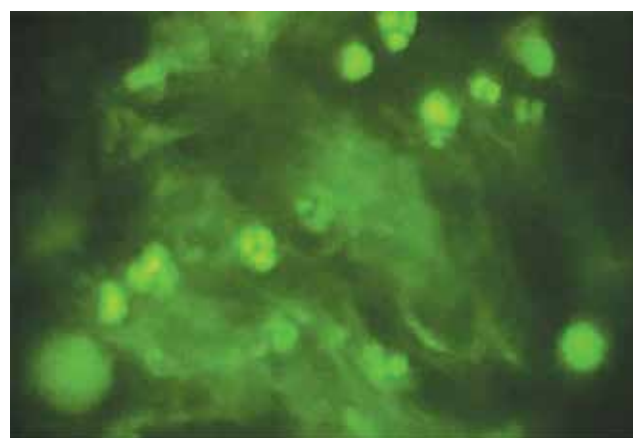


Рис. 6. НЭЛ в морфологической форме вуалей. Вуалеобразные формы НЭЛ получены из нейтрофильных сетей при их инкубации с IgG (5 мкг/мл): время инкубации 30 мин, окрашивание CYBR Green, $\times 1\,000$

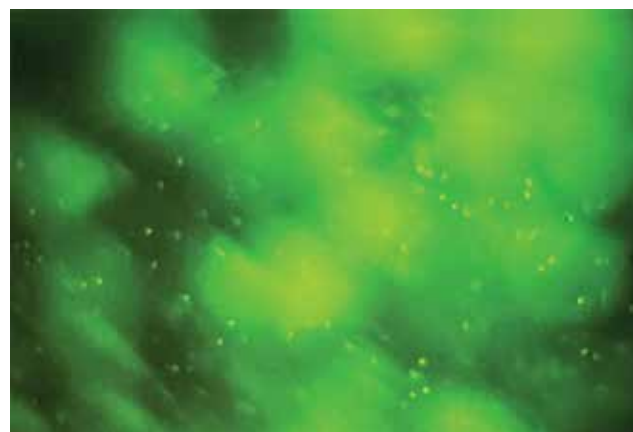


Рис. 7. Ослабление захвата и связывания патогена (*Klebsiella pneumoniae*) вуалеобразными НЭЛ. Периферическое связывание патогена вуалеобразными НЭЛ

Кроме того, что вуалеобразные структуры нейтрофильных внеклеточных образований, сформированные под влиянием IgG, обладают очень слабой способностью к захвату и связыванию патогена, они

еще связывают клетки тестового микроорганизма только на периферии вуалеобразной структуры (см. рис. 7). Такой характер связывания, по-видимому, создает возможность ускользания патогена из-под влияния повреждающих микроорганизмы факторов, продуцирующихся в активированных нейтрофилах.

Необходимо отметить, что подобные вуалеобразные внеклеточные структуры найдены были и у некоторых больных, они также обладали низкой связывающей способностью по отношению к *Klebsiella pneumoniae* и связывали их только на периферии «вуалей».

Результаты исследования функциональной активности НЭЛ в вуалеобразной форме по сравнению с нейтрофильными внеклеточными структурами в морфологической форме нейтрофильных сетей приведены в таблице.

Таблица

Влияние IgG на захват нейтрофильными ловушками микроорганизмов <i>Klebsiella pneumoniae</i> у больных с острыми воспалительными процессами в брюшной полости	
Морфологическая структура НЭЛ и условия инкубации	Количество захваченных нейтрофильными ловушками микроорганизмов, $M \pm m$
Нейтрофильные сети без влияния IgG	$20,2 \pm 1,67$
Вуалеобразные структуры, сформированные под влиянием IgG	$8,46 \pm 0,44^*$

* $p < 0,001$ по сравнению с показателями без влияния IgG.

Помимо ослабления функциональной активности, вуалеобразные формы НЭЛ, по сравнению с НЭЛ в форме нейтрофильных сетей, более подвержены спонтанной ферментативной деградации волокон ДНК, составляющих основу этой морфологической структуры НЭЛ, что включает в себе очевидный риск развития последующих отдаленных осложнений у этих больных. В результате деградации волокон ДНК во внеклеточном пространстве может значительно возрастет содержание внеклеточных пуриновых оснований, которые являются факторами вторичной альтерации. Такой эффект ранее был нами обнаружен и описан у больных с постковидным синдромом. У больных с постковидным синдромом были обнаружены НЭЛ в форме одиночных нитей ДНК значительных размеров. Спонтанная ферментативная деградация этих нитей вызывает увеличение концентрации внеклеточных пуриновых азотистых оснований и является дополнительным фактором тканевого повреждения и ингибирования активности Т-лимфоцитов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования НЭЛ у больных с острым воспалением в брюшной полости позволили выявить зависимость количественных параметров НЭЛ (их численности и размеров) от вида воспаления, размеров и степени отграниченности очага воспаления.

Комплексный анализ НЭЛ, включающий не только количественное определение параметров НЭЛ, но и оценку морфофункциональной трансформации нейтрофильных структур, позволит в полном объеме выявить патофизиологические закономерности воспалительного процесса, послужить ключом к пониманию роли тех или иных форм НЭЛ в борьбе с инфекциями и позволит судить о функциональной активности нейтрофильных экстраклеточных структур.

Функциональная активность НЭЛ, понимаемая как захват и связывание патогена, у здоровых доноров и у больных с острым инфекционным воспалением в брюшной полости имеет некоторые черты сходства, но есть и различия.

Сходство функциональной активности НЭЛ у здоровых доноров и больных людей состоит в том, что контактные взаимодействия патогена и нейтрофилов как здоровых доноров, так и больных людей вызывает формирование НЭЛ в форме нейтрофильных сетей, а затем развивается захват и связывание патогена сформированной нейтрофильной сетью. В ходе этого процесса происходит укорочение волокон ДНК (ретракция), размеры этой нейтрофильной внеклеточной структуры становятся более компактными, а сама нейтрофильная сеть преобразуется в вуалеобразную структуру. Клетки патогена при этом локализованы в центральной части этой вуалеобразной нейтрофильной структуры.

Различия касаются количества клеток патогена, захваченных нейтрофильными внеклеточными структурами в форме вуалей. Вуалеобразные нейтрофильные структуры, происходящие из нейтрофильных сетей здоровых доноров, захватывают и связывают значительное количество клеток тестового патогена, в несколько раз больше, чем подобные вуалеобразные структуры, происходящие из нейтрофильных сетей больных. Часть клеток патогена остается несвязанной при исследовании функциональной активности НЭЛ у больных с воспалительными заболеваниями.

Под влиянием IgG наблюдается морфофункциональная перестройка НЭЛ. Результаты проведенного исследования демонстрируют изменение строения нейтрофильных экстраклеточных ловушек под влиянием IgG. Нейтрофильные сети превращаются

в рыхлые вуалеобразные структуры, которые обладают ослабленной способностью связывать патоген, т. е. приобретают низкую функциональную активность. Особенность функциональной активности IgG-индуцированных НЭЛ – периферическое связывание патогена.

Проведенное исследование демонстрирует вуалеобразные структуры двух видов – «функционально активные вуали», которые образуются из нейтрофильных сетей после захвата патогена, и «неэффективные вуали», которые формируются из нейтрофильных сетей под влиянием IgG. На наш взгляд, эти «неэффективные вуали» несут определенную опасность для организма человека в связи с возможной генерацией факторов вторичной альтерации в виде внеклеточных пуриновых оснований. Содержание этих внеклеточных пуриновых азотистых оснований может существенно увеличиваться в результате спонтанного ферментативного гидролиза ДНК нейтрофильных вуалеобразных структур и индуцировать снижение противоинфекционной резистентности в результате ингибирования активности Т-клеточного звена иммунной системы.

Кроме этого, внеклеточные пуриновые азотистые основания могут вызвать повреждение структур нервной системы и клеток внутренних органов. Их длительное воздействие на организм способно вызывать отдаленные неблагоприятные последствия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С практической точки зрения, проведенное исследование и его результаты создают предпосылки для формирования новых подходов в разработке режимов проведения вакцинации и применения иммунобиологических препаратов, в частности, препаратов моноклональных антител, особенно учитывая тот факт, что в настоящее время отчетливо сформулирован запрос на новые медицинские технологии для повышения эффективности лечения больных.

Недостаток знаний о механизмах сопряжения реакций врожденного иммунитета и адаптивного иммунного ответа в организме человека может существенно ограничивать применение вакцин и препаратов моноклональных антител, а также способствует развитию определенного недоверия у пациентов к данному виду терапии [16]. Описаны случаи тромбоза в сочетании с тромбоцитопенией после вакцинации [17] и прогрессирующей мультифокальной лейкоэнцефалопатии, вызванной полиомавирусом, на фоне лечения препаратами моноклональных антител [18].

По мере расширения показаний для использования препаратов моноклональных антител появля-

ются сообщения об осложнениях и даже летальных случаях после применения этих препаратов [19, 20] в связи с развитием полиорганной недостаточности. Причины негативных последствий после терапии препаратами моноклональных антител еще пока недостаточно изучены, но можно предположить с большой долей вероятности, что формирование неэффективных нейтрофильных вуалей может стать механизмом индукции гемокоагуляции и продукции факторов вторичной альтерации в организме пациентов. Поэтому важно соотносить режим вакцинации и лечения иммунобиологическими препаратами с контролем состояния врожденного иммунитета, в частности, с обнаружением в крови пациентов присутствия спонтанных нейтрофильных сетей.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Chakraborty S., Tabrizi Z., Bhatt N.N., Franciosa S.A., Bracko O. A brief overview of neutrophils in neurological diseases. *Bio-molecules*. 2023;13(5):743. DOI: 10.3390/biom13050743.
2. Казимирский А.Н., Салмаси Ж.М., Порядин Г.В. Анти-вирусная система врожденного иммунитета: патогенез и лечение COVID-19. *Вестник РГМУ*. 2020;(5):5–14. DOI: 10.24075/vrgmu.2020.054.
3. Казимирский А.Н., Салмаси Ж.М., Порядин Г.В., Панина М.И., Рогожина Л.С., Ступин В.А. и др. Нейтрофильные экстраклеточные ловушки при воспалительных заболеваниях брюшной полости. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2024;68(1):15–25. DOI: 10.25557/0031-2991.2024.01.15-25.
4. Казимирский А.Н., Салмаси Ж.М., Порядин Г.В., Панина М.И., Ларина В.Н., Ступин В.А. и др. IgG активирует формирование нейтрофильных экстраклеточных ловушек и модифицирует их структуру. *Бюллетень экспериментальной биологии*. 2022;174(12):786–789. DOI: 10.47056/0365-9615-2022-174-12-786-789.
5. Новиков Д.Г., Золотов А.Н., Кириченко Н.А., Мордык А.В. Способ обнаружения нейтрофильных внеклеточных ловушек в суправитально окрашенном препарате крови. Патент RU 2768 152 C1, 2022.03.23. https://yandex.ru/patents/doc/RU2768152C1_20220323.
6. Новиков Д.Г., Золотов А.Н., Бикбавова Г.Р., Ливзан М.А., Телятникова Л.И. Исследование нейтрофильных внеклеточных ловушек у пациента с язвенным колитом. *Доказательная гастроэнтерология*. 2022;11(2):31–38. DOI: 10.17116/dokgastro20221102131.
7. Казимирский А.Н., Салмаси Ж.М., Порядин Г.В., Панина М.И. Новые возможности диагностики и исследования патогенеза различных видов воспаления. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2022;66(2):34–42. DOI: 10.25557/0031-2991.2022.02.34-42.
8. Казимирский А.Н., Салмаси Ж.М., Порядин Г.В., Панина М.И., Ступин В.А., Ким А.Э. и др. Противоинфекционная защита организма человека с участием нейтрофильных сетей. *Бюллетень сибирской медицины*. 2024;23(1):56–63. DOI: 10.20538/1682-0363-2024-1-56-63.

9. Demkow U. Molecular mechanisms of neutrophil extracellular trap (NETs) degradation. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24(5):4896. DOI: 10.3390/ijms24054896.
10. Farrera C., Fadeel B. macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a silent process. *J. Immunol.* 2013;191:2647–2656. DOI: 10.4049/jimmunol.1300436.
11. Chen L., Zhao Y., Lai D., Zhang P., Yang Y., Li Y. et al. Neutrophil extracellular traps promote macrophage pyroptosis in sepsis. *Cell Death Dis.* 2018;9(6):597. DOI: 10.1038/s41419-018-0538-5.
12. Zhou Y., Xu Z., Liu Z. Impact of neutrophil extracellular traps on thrombosis formation: new findings and future perspective. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2022;12:910908. DOI: 10.3389/fcimb.2022.910908.
13. Lauková L., Konečná B., Janovičová E., Vlková B., Celec P. Deoxyribonucleases and their applications in biomedicine. *Biomolecules.* 2020;10:1036. DOI: 10.3390/biom10071036.
14. Nakazawa D., Shida H., Kusunoki Y., Miyoshi A., Nishio S., Tomaru U. et al. The responses of macrophages in interaction with neutrophils that undergo NETosis. *J. Autoimmun.* 2016;67:19–28. DOI: 10.1016/j.jaut.2015.08.018.
15. Szturmowicz M., Barańska I., Skoczylas A., Jędrych M.E., Demkow U. Correlation of bronchoalveolar lavage lymphocyte count with the extent of lung fibrosis and with plethysmographic lung volumes in patients with newly recognized hypersensitivity pneumonitis. *Cent. Eur. J. Immunol.* 2020;45(3):276–282. DOI: 10.5114/ceji.2020.101246.
16. Connors J., Cusimano G., Mege N., Woloszczuk K., Konopka E., Bell M. et al. Using the power of innate immunoprofiling to understand vaccine design, infection, and immunity. *Hum. Vaccin Immunother.* 2023;19(3):2267295. DOI: 10.1080/21645515.2023.2267295.
17. De Michele M., Kahan J., Berto I., Schiavo O.G., Iacobucci M., Toni D. et al. Cerebrovascular complications of COVID-19 and COVID-19 vaccination. *Circ. Res.* 2022;130(8):1187–1203. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.122.319954.
18. Sharma K., Tolaymat S., Yu H., Elkhooly M., Jaiswal S., Jena A. et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy in anti-CD20 and other monoclonal antibody (mAb) therapies used in multiple sclerosis: A review. *J. Neurol. Sci.* 2022;443:120459. DOI: 10.1016/j.jns.2022.120459.
19. Faccini T., Dhesi Z., Shah S. Death by antibody. *BMJ Case Rep.* 2019;12(5):e225519. DOI: 10.1136/bcr-2018-225519.
20. Kirby C., Herlihy D., Clarke L., Mullan R. Sarcoidosis manifesting during treatment with secukinumab for psoriatic arthritis. *BMJ Case Rep.* 2021;14(2):e240615. DOI: 10.1136/bcr-2020-240615.

Вклад авторов

Казимирский А.Н. – экспериментальные исследования, подготовка иллюстративного материала, написание текста. Салмаси Ж.М. – редактирование статьи. Порядин Г.В. – концепция и дизайн исследования. Панина М.И. – редактирование статьи, статистическая обработка материала. Ким А.Э. – экспериментальные исследования. Рогожина Л.С. – сбор и обработка материала.

Информация об авторах

Казимирский Александр Николаевич – д-р биол. наук, доцент, вед. науч. сотрудник, отдел молекулярных технологий, НИИ трансляционной медицины, профессор кафедры патофизиологии и клинической патофизиологии, Институт биологии и патологии человека, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, г. Москва, alnica10@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3079-4089>

Салмаси Жан Мустафаевич – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой патофизиологии и клинической патофизиологии, Институт биологии и патологии человека, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, г. Москва, profjms@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8524-0019>

Порядин Геннадий Васильевич – д-р мед. наук, профессор кафедры патофизиологии и клинической патофизиологии, чл.-корр. РАН, Институт биологии и патологии человека, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, г. Москва, poryadin_GV@rsmu.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2010-3296>

Панина Марина Ивановна – д-р мед. наук, профессор, профессор кафедры патофизиологии и клинической патофизиологии, Институт биологии и патологии человека, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, г. Москва, pan-mar@list.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7651-0037>

Ким Анна Эрнестовна – ассистент, кафедра патофизиологии и клинической патофизиологии, Институт биологии и патологии человека, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, г. Москва, infoany@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8119-772X>

Рогожина Людмила Сергеевна – ассистент, кафедра госпитальной хирургии № 1, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, г. Москва, lusy-090909@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3983-7890>

(✉) Казимирский Александр Николаевич, alnica10@mail.ru

Поступила в редакцию 06.05.2024;
одобрена после рецензирования 23.05.2024;
принята к публикации 13.06.2024