

УДК 616-002.5:616.155.3]-053.2:612.017.1
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2024-4-95-104>

Характеристика продукции нейтрофильных внеклеточных ловушек и концентрации цитруллинированного гистона H3 у детей, больных туберкулезом

Новиков Д.Г., Золотов А.Н., Индутный А.В., Мордык А.В., Кириченко Н.А.,
Романова М.А., Птухин А.О.

Омский государственный медицинский университет (ОмГМУ)
Россия, 644099, г. Омск, ул. Ленина, 12

РЕЗЮМЕ

Цель исследования: охарактеризовать показатели продукции нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) в культуре лейкоцитов и концентрацию цитруллинированного гистона H3 (citH3) периферической крови для оценки возможных особенностей реализации нетоза у детей, больных туберкулезом.

Материалы и методы. В исследование вошли 20 детей с активным туберкулезом органов дыхания (группа «Туберкулез») и 20 клинически здоровых детей без признаков сенсibilизации к антигенам *Mycobacterium tuberculosis* (группа «Контроль»). Выясняли способность нейтрофилов к формированию НВЛ при воздействии *ex vivo* на них неспецифического антигенного стимулятора и исследовали концентрацию цитруллинированного гистона H3 в периферической крови.

Результаты. Нейтрофилы больных туберкулезом детей чаще, чем детей в группе «Контроль», формировали нитевидные НВЛ ($Me = 21,0$ и $Me = 16,0$ соответственно; $p = 0,0474$) и облаковидные НВЛ ($Me = 10,5$ и $Me = 4,0$ соответственно; $p = 0,0068$). В обеих группах преобладали нитевидные НВЛ. Однако облаковидные НВЛ были отмечены у всех представителей группы «Туберкулез» (100%), а в группе «Контроль» были выявлены только у 15 из 20 обследуемых ($\chi^2 = 16,01$; $p < 0,0068$). В группе «Туберкулез» медиана концентрации citH3 в крови была в 18,9 раза выше, чем в группе «Контроль» ($Me = 26,5$ и $Me = 1,4$ соответственно; $p = 0,0041$). Выявлена сильная положительная корреляционная взаимосвязь между концентрацией citH3 и генерацией нитевидных ($r = 0,86$; $p = 0,0137$), но не облаковидных форм НВЛ в группе «Туберкулез» и контрольной группе ($r = 0,95$; $p = 0,0008$).

Заключение. Высокий уровень citH3 в группе «Туберкулез» может отражать его нетоз-индуцированную продукцию и быть следствием возросшей активности данного процесса *in vivo*. Существенную роль в этом может играть ранее сформированная потенциальная готовность нейтрофилов к образованию НВЛ (пронетотический фенотип), что согласуется с нашим наблюдением о возрастании способности к формированию внеклеточных ловушек *ex vivo* изолированных нейтрофилов обследуемых лиц данной группы.

Ключевые слова: туберкулез у детей, нейтрофильные внеклеточные ловушки, цитруллинированный гистон H3, способность нейтрофилов к формированию внеклеточной ловушки

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

Источник финансирования. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-25-10043, <https://rscf.ru/project/23-25-10043/>

Соответствие принципам этики. Информированное согласие было получено от законных представителей участников исследования. Исследование одобрено этическим комитетом ОмГМУ (протокол № 5 от 28.04.2023).

✉ Кириченко Николай Александрович, honomer_1608@mail.ru

Для цитирования: Новиков Д.Г., Золотов А.Н., Индутный А.В., Мордык А.В., Кириченко Н.А., Романова М.А., Птухин А.О. Характеристика продукции нейтрофильных внеклеточных ловушек и концентрации цитруллинированного гистона H3 у детей, больных туберкулезом. *Бюллетень сибирской медицины*. 2024;23(4):95–104. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2024-4-95-104>.

NETs production and citrullinated histone H3 level in children with tuberculosis

Novikov D.G., Zolotov A.N., Indutny A.V., Mordyk A.V., Kirichenko N.A., Romanova M.A., Ptukhin A.O.

Omsk State Medical University
12, Lenina Str., Omsk, 644099, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. To characterize parameters of neutrophil extracellular trap (NET) production in the leukocyte culture and citrullinated histone H3 (citH3) level in peripheral blood to assess the features of NETosis in children with tuberculosis.

Materials and methods. The study included 20 children with active pulmonary tuberculosis (TB group) and 20 clinically healthy children without signs of sensitization to *Mycobacterium tuberculosis* antigens (control group). The ability of neutrophils to form NETs under *ex vivo* exposure to a non-specific immune stimulant and the concentration of citH3 in peripheral blood were investigated.

Results. Neutrophils in children with tuberculosis formed filamentous NETs ($Me = 21.0$ and $Me = 16.0$, respectively; $p = 0.0474$) and cloud-like NETs ($Me = 10.5$ and $Me = 4.0$, respectively; $p = 0.0068$) more frequently than the controls. Filamentous NETs prevailed in both groups. However, cloud-like NETs were registered in all patients in the TB group (100%) and only in 15 of 20 children in the control group ($\chi^2 = 16.01$; $p < 0.0068$). The concentration of citH3 in the blood was 18.9 times higher in the TB group than in the control group ($Me = 26.5$ and $Me = 1.4$, respectively; $p = 0.0041$). A strong positive correlation was found between the citH3 concentration and the generation of filamentous ($r = 0.86$; $p = 0.0137$), but not cloud-like NETs ($r = 0.95$; $p = 0.0008$) in both groups.

Conclusion. The high level of citH3 in the TB group can reflect its NETosis-induced release and be caused by increased NETosis *in vivo*. This may be due to the previously formed potential of neutrophils to generate NETs (a proNETotic phenotype), which is consistent with our observation of an increased ability of isolated neutrophils to form extracellular traps *ex vivo* in children of the TB group.

Keywords: tuberculosis in children, neutrophil extracellular traps (NETs), citrullinated histone H3, neutrophils ability to form an extracellular trap

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 research was funded by the Russian Science Foundation grant No. 23-25-10043, <https://rscf.ru/project/23-25-10043/>

Conformity with the principles of ethics. An informed consent was obtained from legal representatives of the study participants. The study was approved by the Ethics Committee at Omsk State Medical University (Protocol No. 5 of 28.04.2023).

For citation: Novikov D.G., Zolotov A.N., Indutny A.V., Mordyk A.V., Kirichenko N.A., Romanova M.A., Ptukhin A.O. NETs production and citrullinated histone H3 level in children with tuberculosis. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2024;23(4):95–104. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2024-4-95-104>.

ВВЕДЕНИЕ

Инфицирование *Micobacterium tuberculosis* сопровождается увеличением количества Th1- и Th2-лимфоцитов, что может способствовать развитию дисбаланса иммунных реакций у больных туберкулезом легких [1]. Изменение регуляции иммунного ответа сопряжено с формированием особого цитокинового профиля [2], который в свою очередь может обусловить экстренный гранулоцитопоз, что в конечном итоге реструктурирует функциональные возможности нейтрофилов [3].

Формирование нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ), или нетоз, – механизм неспецифической защиты, обеспечиваемой нейтрофильными лейкоцитами в ответ на стимуляцию агентами как бактериального, так и небактериального происхождения, открыт в 2004 г. V. Brinkmann и A. Zychlinsky [4]. НВЛ представляют собой надмолекулярные структуры, состоящие из деконденсированных ДНК-гистоновых комплексов с фиксированными на их поверхности белками, высвободившимися из гранул нейтрофилов: нейтрофильной эластазой, миелопероксидазой и другими специализированными белками [5]. Такой состав НВЛ вносит свой вклад в бактерицидную функцию, что, несомненно, значительно при различных инфекционных заболеваниях, в том числе при туберкулезе. Нарушение процесса нетоза может оказывать существенное влияние на развитие целого ряда заболеваний и риски появления их осложнений [6].

Есть свидетельства того, что у пациентов с тяжелыми формами туберкулеза наблюдались выраженные проявления нетоза [7, 8]. Рутинным способом изучения нетоза является люминесцентная микроскопия [9]. В соответствующих методиках анализа применяются различные ДНК-интеркалирующие красители и флуоресцентно-меченные антитела к компонентам нейтрофильных лейкоцитов [9]. Было показано, что процесс образования НВЛ в ответ на антигенную стимуляцию сопровождался морфологически различающимися люминесцентно-микроскопическими феноменами, наблюдаемыми в препарате [10, 11]. При этом были выявлены как так называемые облаковидные, так и, соответственно, нитевидные формы НВЛ, что может отражать разную степень деконденсации хроматина, формирующего данные формы ловушек. В свою очередь, превалирование некоторой определенной формы (среди всех наблюдаемых в препарате) ловушек оказалось связанным с характером течения туберкулезной инфекции [12]. Известно, что процесс деконденсации хроматина при нетозе обеспечивается модификаци-

ей гистонов, нарушающей их нековалентное взаимодействие с ДНК.

Показано, что при нетозе наблюдается цитруллинизация гистонов, в том числе гистона H3 с модификацией аминокислотных остатков аргинина R2, R8, R17 [4, 13, 14]. В частности, в нейтрофилах, полученных от взрослых лиц, больных туберкулезом, обнаруживалась иммунофлуоресцентная метка к цитруллинированному гистону H3 (citH3) после стимулирования их *M. tuberculosis*, тогда как у здоровых лиц – нет [15]. У взрослых лиц его концентрация в крови была взаимосвязана со степенью тяжести течения туберкулеза, наличием полостей распада [8]. Отмечено, что citH3 может быть определен в сыворотке крови, в том числе и как маркер состоявшегося нетоза [4]. Вместе с тем остается открытым вопрос о том, насколько уровень циркулирующего в крови citH3 может быть взаимосвязанным с активностью процессов посттрансляционной энзиматической модификации гистонов в нейтрофильных лейкоцитах больных туберкулезом при нетозе. Учитывая тот факт, что нетоз у детей может сопровождаться избыточной активацией нейтрофилов и более выраженным образованием НВЛ в сравнении со взрослыми [16], задача по изучению участия нетоза при инфекционном процессе у детей, вызванным *M. tuberculosis*, является актуальной и медицински значимой. Литературных данных о концентрации citH3 в периферической крови во взаимосвязи с характеристикой способности нейтрофилов к формированию НВЛ у детей с туберкулезом легких в доступных информационных источниках не найдено.

Цель исследования: охарактеризовать показатели продукции нейтрофильных внеклеточных ловушек в культуре лейкоцитов и концентрацию цитруллинированного гистона H3 периферической крови для оценки возможных особенностей реализации нетоза у детей, больных туберкулезом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 20 детей с активным туберкулезом органов дыхания (группа «Туберкулез») и 20 клинически здоровых детей (группа «Контроль»). Группа «Туберкулез» включала 14 детей с диагнозом «первичный туберкулезный комплекс» (ПТК), трех детей с диагнозом «инфильтративный туберкулез легких» (ИТЛ) и трех детей с диагнозом «туберкулез внутригрудных лимфатических узлов с бронхо-легочным поражением», поступивших в 2022–2023 гг. на лечение в БУЗОО «Специализированная детская туберкулезная клиническая больница» (г. Омск). Критерии включения в группу «Туберкулез»: возраст от 4 до 14 лет; наличие впер-

вые выявленного активного туберкулеза органов дыхания, установленного центральной контрольной комиссией противотуберкулезного учреждения; назначение химиотерапии по поводу впервые выявленного туберкулеза; информированное согласие родителей (или законных представителей) ребенка на включение в исследование. Критерии исключения: наличие сопутствующих заболеваний, выявление изолированного внелегочного туберкулеза.

В контрольную группу вошли здоровые дети, наблюдавшиеся в детском отделении БУЗОО «Городская поликлиника № 10» (г. Омск), у которых по результатам ежегодного обследования отмечена отрицательная реакция на туберкулин. Обследуемые были подобраны по методу «копия – пара» по полу и возрасту к детям из группы «Туберкулез». Критерии включения: отрицательная реакция в пробе Манту с 2 ТЕ; отсутствие контакта с больными туберкулезом; информированное согласие родителей (законных представителей) ребенка на включение в исследование. Критерии исключения: наличие иммунопатологических заболеваний, острые респираторные

заболевания, перенесенные в течение 1 мес перед исследованием.

В группах «Контроль» и «Туберкулез» оценивали способность изолированной фракции нейтрофилов к формированию НВЛ по методике, описанной в патенте на изобретение [17]. После выделения культуры нейтрофилов на градиенте фиколла-верографина оценивали нетоз-формирующую способность нейтрофилов. Поскольку для нейтрофилов нехарактерна специфическая чувствительность к антигенам, мы применяли прием, провоцирующий нейтрофилы к формированию НВЛ: нейтрофилы инкубировали в течение 30 мин при 37 °С в среде, содержащей неспецифический антигенный стимулятор (смесь *Lactobacillus (L.) reuteri*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *Bifidobacterium longum*). По завершении инкубации при люминесцентной микроскопии подсчитывали количество люминесцентно-позитивных объектов в препарате: нейтрофилов (интактных, активированных и гиперактивированных), клеток раннего нетоза, НВЛ с дифференциацией облаковидных и нитевидных вариантов формы (рис. 1).

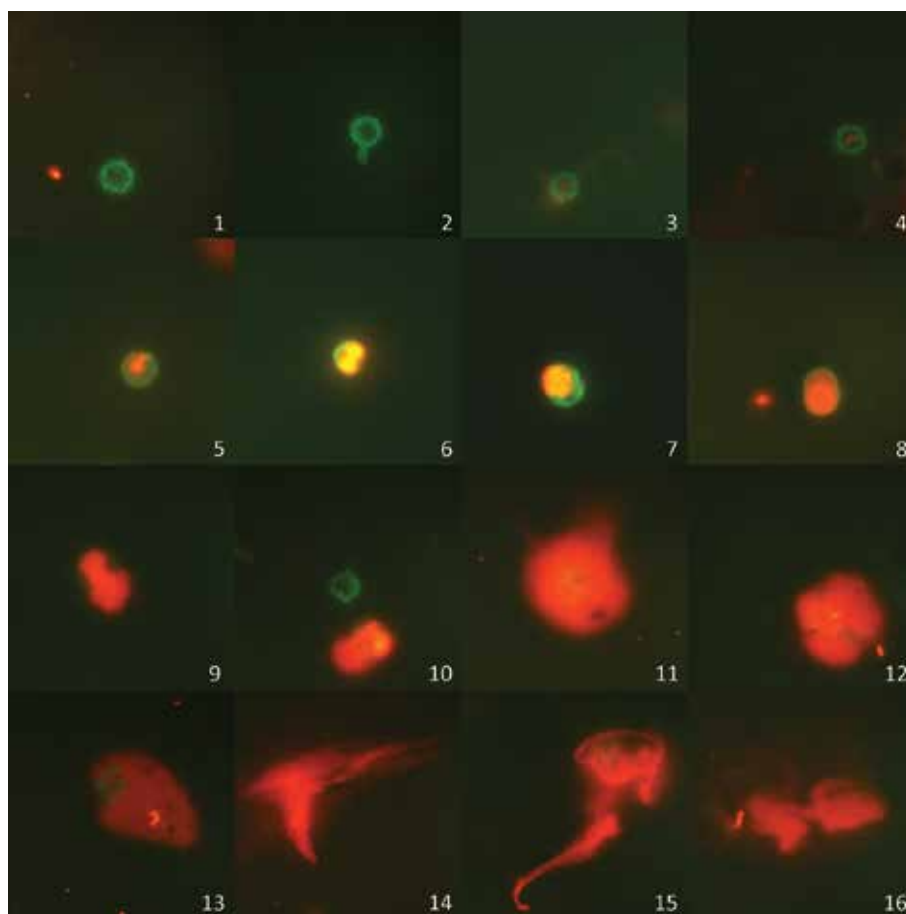


Рис. 1. Микрофотографии объектов, обнаруженных в препарате изолированной фракции нейтрофилов: 1, 2 – интактные нейтрофилы; 3, 4 – гипоактивированные нейтрофилы; 5, 6 – активированные нейтрофилы; 7, 8 – гиперактивированные нейтрофилы; 9 – клетки раннего нетоза; 10 – интактный нейтрофил (вверху), клетка раннего нетоза (внизу); 11 – облаковидная нейтрофильная внеклеточная ловушка; 12, 13 – облаковидные нейтрофильные внеклеточные ловушки с захваченной бактерией; 14, 15 – нитевидные нейтрофильные внеклеточные ловушки; 16 – нитевидная нейтрофильная внеклеточная ловушка с захваченной бактерией; люминесцентная микроскопия, $\times 1000$

Полученные значения выражали в процентах от общего количества люминесцентно-позитивных объектов (ЛПО) в препарате. Кроме того, рассчитывали коэффициент захвата НВЛ – отношение захваченных ловушкой объектов к общему количеству НВЛ. Отрицательный контроль при исследовании способности нейтрофила к формированию НВЛ проводили путем инкубации культуры нейтрофилов с 0,9%-м NaCl в объеме, равном объему неспецифического антигенного стимулятора, использованному в основной серии исследования. Концентрацию citH3 определяли в образцах сыворотки периферической крови в соответствии с инструкцией производителя тест-системы Citrullinated Histone H3 (Clone 11D3) ELISA Kit (Cayman Chemical Company, США).

Статистический анализ полученных результатов проводился с использованием программы Statistica 8.0. Характер распределения данных в исследуемых группах оценивали с помощью *W*-теста Шапиро – Уилка. Поскольку полученные данные имели отличное от нормального распределение, результа-

ты представлены с указанием медианы и межквартильного размаха ($Me (Q_1; Q_3)$). Для расчета статистической значимости различий для независимых выборок использовался *U*-критерий Манна – Уитни. Сопряженность варьирования значений показателей *ex vivo* способности нейтрофилов к формированию НВЛ и концентрации citH3 периферической крови оценивали с помощью коэффициента ранговой корреляции *r*-Спирмена. С использованием критерия χ^2 Пирсона проведено сравнение форм распределения отдельных люминесцентно-микроскопических признаков в пределах исследуемых групп. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Нейтрофилы, выделенные из периферической крови детей из группы «Туберкулез», чаще формировали НВЛ при инкубации в присутствии антигенного стимулятора (в сравнении с группой «Контроль»). Количество НВЛ от всех ЛПО (100%) в группе «Туберкулез» составило 31,5% (26,4; 39,6), а в группе «Контроль» – 21,1% (19,3; 23,8), $p = 0,0087$ (рис. 2).

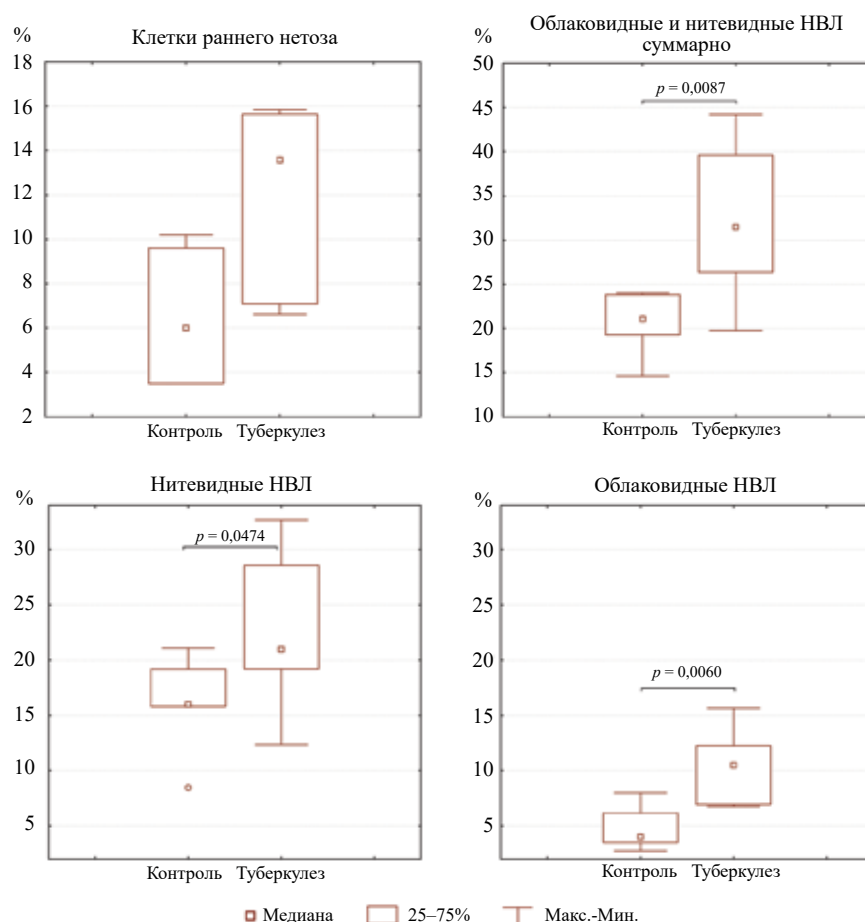


Рис. 2. Люминесцентно-позитивные объекты в препарате изолированных нейтрофилов после воздействия стимулятора: клетки раннего нетоза, нейтрофильные внеклеточные ловушки (за 100% приняты все люминесцентно-позитивные объекты)

Нейтрофилы детей группы «Туберкулез» формировали преимущественно нитевидные НВЛ: 21,0% (19,2; 28,6), в сравнении с группой «Контроль» – 16,0% (15,8; 19,2), $p = 0,0474$ (рис. 3). Облаковидные НВЛ у детей контрольной группы в препаратах нейтрофилов обнаруживались реже, чем у детей в группе «Туберкулез»: 4,0% (3,5; 6,2) и 10,5% (6,9; 12,3) соответственно, $p = 0,0060$.

Однако в препаратах нейтрофилов у пяти детей группы «Контроль» они не были обнаружены, тогда как в группе «Туберкулез» облаковидные НВЛ были выявлены у всех обследуемых ($\chi^2 = 16,01$; $p < 0,0068$). Коэффициент захвата НВЛ (рис. 4) у детей контрольной группы имел сопоставимые с группой «Туберкулез» значения ($p > 0,05$). В отрицательном контроле НВЛ отсутствовали.

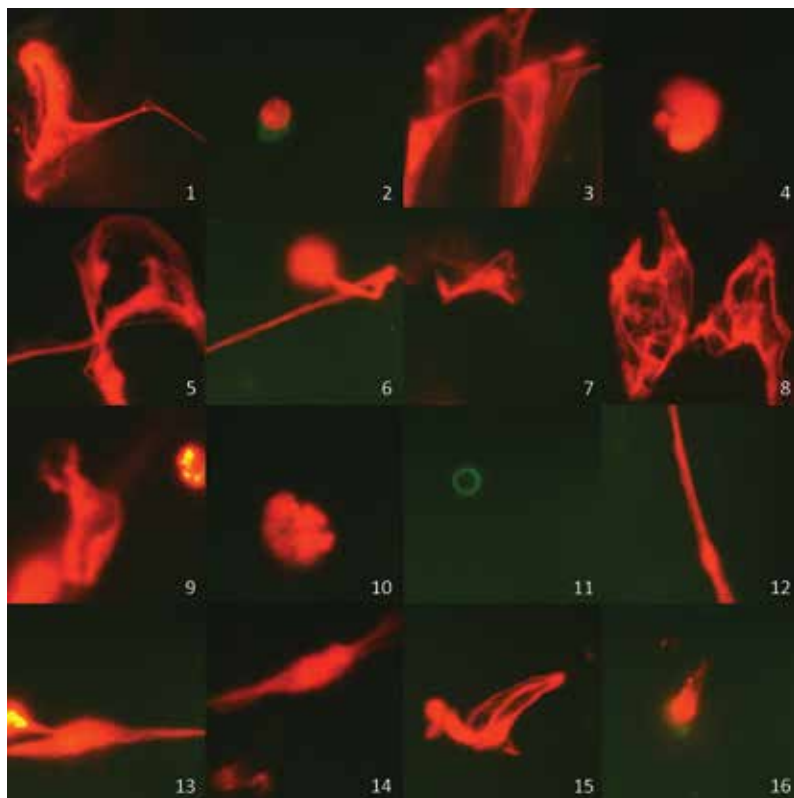


Рис. 3. Примеры полей зрения в препарате изолированных нейтрофилов у детей, больных туберкулезом, после воздействия неспецифического антигенного стимулятора: нитевидные нейтрофильные внеклеточные ловушки (1, 3, 5–9, 12–15), облаковидные нейтрофильные внеклеточные ловушки (4, 10), клетка раннего не-тоза (16), гиперактивированный нейтрофил (2), интактный нейтрофил (11); люминесцентная микроскопия, $\times 1\,000$

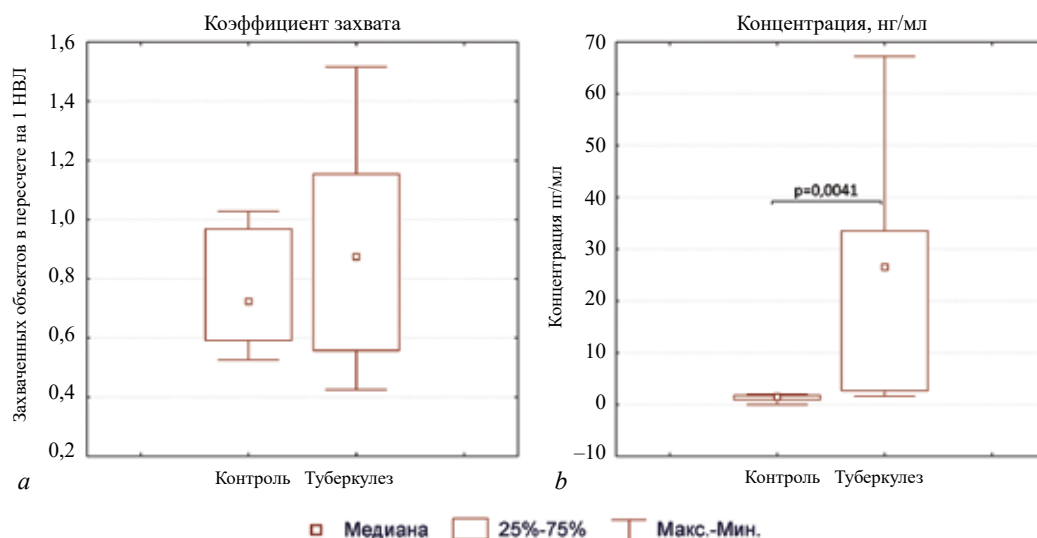


Рис. 4. Коэффициент захвата нейтрофильных внеклеточных ловушек (а); концентрация цитруллинированного гистона НЗ в периферической крови (б)

В сравнении с контрольной группой в крови детей, больных туберкулезом, медиана концентрации citH3 (см. рис. 4) была в 18,9 раза выше ($p = 0,0041$, U -критерий Манна – Уитни). В группе «Контроль» ее значения составили 1,4 (0,9; 1,8) нг/мл, а в группе «Туберкулез» – 26,5 (2,7; 33,6) нг/мл.

После инкубации нейтрофилов в присутствии неспецифического антигенного стимулятора в препаратах было отмечено закономерное снижение количество интактных нейтрофилов, являющееся вероятным следствием их активации с формированием ими НВЛ. Количество интактных нейтрофилов от общего количества ЛПО в препаратах в группе детей, больных туберкулезом, составило 34,6% (26,7; 40,7), тогда как в контрольной группе это значение было существенно выше: 54,0% (46,3; 61,4), $p = 0,0040$ (U -критерий Манна – Уитни). Также в группе «Туберкулез» была несколько ниже доля гипоактивированных нейтрофилов 2,6% (1,2; 4,9) в сравнении с группой «Контроль» 6,0% (4,8; 6,9); $p = 0,0295$. Между исследуемыми группами не выявлено статистически значимых различий по показателям распределения численности активированных и гиперактивированных нейтрофилов ($p > 0,05$).

Исследование корреляционных связей в группе «Контроль» показало наличие двух сильных корреляций между концентрацией citH3 в крови и долей нитевидных НВЛ ($r = 0,95$; $p = 0,0008$), между citH3 в крови и долей клеток раннего нетоза ($r = 0,77$; $p = 0,0408$). Исследование корреляционных связей в группе «Туберкулез» показало наличие трех сильных взаимосвязей между концентрацией citH3 в крови и долей (в %) нитевидных НВЛ ($r = 0,86$; $p = 0,0137$), между citH3 в крови и долей всех НВЛ ($r = 0,89$; $p = 0,0068$). Корреляционная взаимосвязь между citH3 в крови и долей гиперактивированных форм нейтрофилов была отрицательной ($r = -0,89$; $p = 0,0068$). Других статистически значимых корреляционных связей между концентрацией citH3 в периферической крови и долей отдельных ЛПО не обнаружено.

ОБСУЖДЕНИЕ

Разнообразие методических подходов и отсутствие лабораторного золотого стандарта в изучении НВЛ приводит к неоднозначности трактовок получаемых научных результатов. По многим вопросам, касающимся морфологии НВЛ, механизмов, источников их образования, а также регуляции этого процесса, ведущим исследователям в этой области до сих пор не удалось достичь консенсуса [18]. В большинстве публикаций на микрофотографиях, полученных с применением флуоресцентных красителей

для визуализации НВЛ или ее компонентов, ловушки были представлены нитевидными структурами [19]. Однако ряд авторов указывает на то, что НВЛ могут принимать и облаковидную форму [11, 18].

В отличие от большинства исследователей, Shida Yousefi и соавт. предполагают, что факт появления облаковидных структур, состоящих преимущественно из внеклеточной ДНК, после воздействия на нейтрофилы теми или иными агентами не является результатом нетоза, а обусловлен иными формами клеточной смерти, сопряженными с цитолизом. Таким образом, авторы не относят облаковидные структуры к «истинным НВЛ», тогда как в качестве НВЛ обосновывают рассмотрение нитевидных структур, источником которых является митохондриальная ДНК [20, 21]. Указанные авторы считают образование нитевидных структур нормальным врожденным иммунным ответом, тогда как появление облаковидных структур предполагают сопряженным с формированием так называемого порочного круга воспаления и, как его следствие, с формированием аутоиммунного процесса [20, 21]. Вне зависимости от путей и механизмов образования надмолекулярных облаковидных структур, включающих в состав нуклеопротеины, мнение, высказанное Shida Yousefi и соавт., согласуется с полученными нами результатами.

В нашем исследовании именно у больных туберкулезом обнаруживалось существенно большее количество облаковидных НВЛ в сравнении с группой контроля, в которой такие НВЛ были единичными. Нитевидные же ловушки были в достаточно большом количестве представлены и у здоровых детей. Возможно, именно присутствие облаковидных НВЛ взаимосвязано с развитием компонентов аутоиммунной реакции, наблюдающейся при туберкулезе. Так, у больных туберкулезом в ряде исследований были обнаружены аутоантитела к различным аутоантигенам [22].

Одна из причин такого ответа – циркуляция в крови молекулярных фрагментов, ассоциированных с повреждениями (damage/danger-associated molecular patterns – DAMP) [22]. DAMP – достаточно гетерогенная группа молекул, к которой, в частности, относятся и гистоны [23], обладающие также и прямой цитотоксичностью [24]. Ранее при обследовании взрослых больных туберкулезом обнаружено, что более высокая концентрация citH3 , процесс образования которого тесно связывают с нетозом [4, 13, 14], сопряжена с увеличением содержания нейтрофилов в крови, наличием полостей распада в легких и низкой эффективностью противотуберкулезной терапии [8]. Это согласуется с нашими результатами, показавшими значимо большее содержание citH3 в сыворотке крови у детей, больных туберкулезом,

в сравнении со здоровыми детьми. Уровень citH3 у детей, больных туберкулезом, в нашем прежнем исследовании был значительно выше, чем у взрослых с полостью распада (что было выявлено идентичными тест-системами, использовавшимися в обоих исследованиях) [8]. Вероятно, на начальных этапах туберкулезной инфекции нетоз может играть более существенную роль в развитии аутовоспаления.

Кроме того, в настоящем исследовании уровень citH3 в сыворотке крови был взаимосвязан с образованием нитевидных, но не облаковидных НВЛ лейкоцитами периферической крови. При этом, вероятно, источником citH3 в сыворотке крови являются НВЛ, сформировавшиеся в очаге воспаления. А оцениваемая нами способность нейтрофилов периферической крови к образованию НВЛ описывает пронетотический фенотип нейтрофильных лейкоцитов, которые с большей вероятностью образуют НВЛ в условиях хронического воспаления [20]. Наличие указанной выше взаимосвязи, вероятно, можно объяснить, сравнив полученные нами результаты с исследованием Florence Guillotin и соавт. [19].

Данный авторский коллектив позиционирует наличие структур нитевидной формы, содержащих ДНК и распознаваемых антителами к миелопероксидазе и citH3, как морфологический эквивалент витального нетоза, наблюдаемый при люминесцентной микроскопии [19]. Такой подход является несколько противоречивым – он построен на совокупности гипотез, а также не согласуется с мнением Shida Yousefi и соавт., предполагающих, что источник нитевидных структур – ДНК митохондрий [20, 21]. Однако при этом следует учитывать, что митохондриальная ДНК не содержит гистонов [25]. Эквивалентами прочих видов нетоза, названных в статье «невитальным нетозом», являются нитевидные структуры, не содержащие citH3 [19]. Тогда как учет облаковидных структур в дизайне данного исследования не был предусмотрен. Вероятно, одновременно с витальным наблюдался суицидальный и иные разновидности нетоза. При этом невитальный нетоз в указанном исследовании преобладал в группе с патологией (преэклампсией) в сравнении с группой контроля, а нетоз, сочетавшийся с модификацией гистонов, – в обеих группах [19].

В связи с этим остается открытым вопрос, являются ли наблюдаемые нами облаковидные ДНК-содержащие структуры разновидностью суицидального нетоза или иным видом клеточной гибели. Но есть вероятность того, что они отражают процесс, не требующий регуляции деконденсации хроматина, опосредованной энзиматической модификацией гистонов. Появление данного феномена может отражать и

развитие аутоиммунного компонента воспаления. В то же время повышение концентрации citH3 у детей, больных туберкулезом, может отражать эффективность врожденного иммунного ответа и являться нормальным компенсаторно-приспособительным процессом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В сравнении со здоровыми детьми в крови детей, больных туберкулезом, наблюдалось большее содержание citH3. В исследовании *ex vivo* после воздействия неспецифического антигенного стимулятора на культуру нейтрофилов периферической крови детей, больных туберкулезом, относительное количество НВЛ нитевидной и облаковидной формы было более высоким, чем в аналогичном эксперименте с нейтрофилами здоровых детей. Установлено, что и у здоровых, и у больных туберкулезом детей количество сформированных *ex vivo* нитевидных форм НВЛ было прямо пропорционально уровню citH3 крови. Вместе с тем подобного сопряжения между количеством облаковидных форм НВЛ и уровнем citH3 крови не обнаружено. Вероятно, что более высокий уровень продукта энзиматической модификации – citH3 в крови детей, больных туберкулезом – отражает более высокую активность нетоза *in vivo*, которая, в свою очередь, может быть следствием роста потенциальных возможностей нейтрофилов к образованию НВЛ.

Воздействие многочисленных факторов иммунного ответа при туберкулезной инфекции, вероятно, определяет такое формирование своеобразного пронетотического фенотипа нейтрофила. Учитывая низкую иммунологическую специфичность нейтрофилов, можно предположить, что в данной ситуации повышенной готовности к нетозу круг антигенных структур, способных выступать в качестве триггеров и стимуляторов нетоза, может существенно расширяться. В частности, стимуляторами нетоза в таких условиях могут выступать и антигены нормальной микробиоты человека, включая антигены бактериальных кишечных симбионтов, на что, вероятно, и указывают результаты нашего исследования.

Полученные данные свидетельствуют о том, что методические подходы к изучению нетоза *in vivo* и *ex vivo*, реализованные нами, имеют неравнозначную информативность и способны взаимодополнять друг друга, поскольку характеризуют разные стороны изучаемых явлений нетоза. У детей, больных туберкулезом, существенно более распространенным оказалось образование облаковидных форм НВЛ в культуре нейтрофилов периферической крови в ответ на оказываемое индуцирующее воздей-

ствие. Данный вариант формы НВЛ исследователи характеризуют как аномальные [21]. Такая неэффективность реакции нетоза при длительном течении заболевания может иметь существенное значение в аспекте формирования предрасположенности к аутовоспалению и иммунопатологии. Изучение этих вопросов может стать предметом отдельного направления исследований.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Санина А.Е., Серебрякова В.А., Уразова О.И., Гаджиев А.А. Сигнальный путь Notch в развитии дисбаланса иммунных реакций у больных диссеминированным туберкулезом легких. *Бюллетень сибирской медицины*. 2023;22(4):92–99. DOI: 10.20538/1682-0363-2023-4-92-99.
2. Rook G.A. Th2 cytokines in susceptibility to tuberculosis. *Curr. Mol. Med.* 2007;7(3):327–337. DOI: 10.2174/156652407780598557.
3. Manz M.G., Boettcher S. Emergency granulopoiesis. *Nat. Rev. Immunol.* 2014;14(5):302–314. DOI: 10.1038/nri3660.
4. Tilley D.O., Abuabed U., Zimny Arndt U., Schmid M., Florian S., Jungblut P.R. et al. Histone H3 clipping is a novel signature of human neutrophil extracellular traps. *Elife*. 2022;11:e68283. DOI: 10.7554/eLife.68283.
5. Kasprzycka W., Homa-Mlak I., Mlak R., Malecka-Massalska T. Direct and indirect methods of evaluating the NETosis process. *J. Pre. Clin. Res.* 2019;13(1):50–56. DOI: 10.26444/jpcr/105563.
6. Huang J., Hong W., Wan M., Zheng L. Molecular mechanisms and therapeutic target of NETosis in diseases. *Med. Comm.* (2020). 2022;3(3):e162. DOI: 10.1002/mco2.162.
7. Schechter M.C., Buac K., Adekambi T., Cagle S., Celli J., Ray S.M. et al. Neutrophil extracellular trap (NET) levels in human plasma are associated with active TB. *PLoS One*. 2017;12(8):e0182587. DOI: 10.1371/journal.pone.0182587.
8. De Melo M.G.M., Mesquita E.D.D., Oliveira M.M., da Silva-Monteiro C., Silveira A.K.A., Malaquias T.S. et al. Imbalance of net and alpha-1-antitrypsin in tuberculosis patients is related with hyper inflammation and severe lung tissue Damage. *Front. Immunol.* 2019;9:3147. DOI: 10.3389/fimmu.2018.03147.
9. De Buhr N., von Köckritz-Blickwede M. How neutrophil extracellular traps become visible. *J. Immunol. Res.* 2016;2016:4604713. DOI: 10.1155/2016/4604713.
10. Мордык А.В., Золотов А.Н., Новиков Д.Г., Романова М.А., Кириченко Н.А., Птухин А.О. Нетозобразующая способность нейтрофилов у детей с латентной туберкулезной инфекцией при положительной пробе с аллергеном туберкулезным рекомбинантным. *Вопросы практической педиатрии*. 2023;18(5):7–12. DOI: 10.20953/1817-7646-2023-5-7-12.
11. Daniel C., Leppkes M., Muñoz L.E., Schley G., Schett G., Herrmann M. Extracellular DNA traps in inflammation, injury and healing. *Nat. Rev. Nephrol.* 2019;15(9):559–575. DOI: 10.1038/s41581-019-0163-2.
12. Мордык А.В., Золотов А.Н., Новиков Д.Г., Кириченко Н.А., Пахтусова П.О., Птухин А.О. Нетозформирующая способность нейтрофилов у пациентов с ограниченным и распространенным туберкулезным процессом. *Туберкулез и болезни легких*. 2023;101(3):78–86. DOI: 10.58838/2075-1230-2023-101-3-78-86.
13. Wang Y., Li M., Stadler S., Correll S., Li P., Wang D. et al. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J. Cell Biol.* 2009;184(2):205–213. DOI: 10.1083/jcb.200806072.
14. Cuthbert G.L., Daujat S., Snowden A.W., Erdjument-Bromage H., Hagiwara T., Yamada M. et al. Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell*. 2004;118(5):545–553. DOI: 10.1016/j.cell.2004.08.020.
15. Ong C.W., Elkington P.T., Brilha S., Ugarte-Gil C., Tome-Esteban M.T., Tezera L.B. et al. Neutrophil-derived MMP-8 drives AMPK-dependent matrix destruction in human pulmonary tuberculosis. *PLoS Pathog.* 2015;11(5):e1004917. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004917.
16. Appelgren D., Enocsson H., Skogman B.H., Nordberg M., Perander L., Nyman D. et al. Neutrophil extracellular traps (NETs) in the cerebrospinal fluid samples from children and adults with central nervous system infections. *Cells*. 2019;9(1):43. DOI: 10.3390/cells9010043.
17. Новиков Д.Г., Золотов А.Н., Кириченко Н.А., Мордык А.В. Способ обнаружения нейтрофильных внеклеточных ловушек в суправитально окрашенном препарате крови. Патент на изобретение № 2768152. Оpubl. 23.03.2022. Бюл. № 9.
18. Boeltz S., Amini P., Anders H.J., Andrade F., Bilyy R., Chatfield S. et al. To NET or not to NET: current opinions and state of the science regarding the formation of neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ.* 2019;26(3):395–408. DOI: 10.1038/s41418-018-0261-x.
19. Guillotin F., Fortier M., Portes M., Demattei C., Mousty E., Nouvellon E. et al. Vital NETosis vs. suicidal NETosis during normal pregnancy and preeclampsia. *Front. Cell Dev. Biol.* 2023;10:1099038. DOI: 10.3389/fcell.2022.1099038.
20. Yousefi S., Simon D., Stojkov D., Karsonova A., Karaulov A., Simon H.U. In vivo evidence for extracellular DNA trap formation. *Cell Death Dis.* 2020;11(4):300. DOI: 10.1038/s41419-020-2497-x.
21. Yousefi S., Simon H.U. NETosis – does it really represent nature's “suicide bomber”? *Front. Immunol.* 2016;7:328. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00328.
22. Belyaeva I.V., Kosova A.N., Vasiliev A.G. Tuberculosis and autoimmunity. *Pathophysiology*. 2022;29(2):298–318. DOI: 10.3390/pathophysiology29020022.
23. Roh J.S., Sohn D.H. Damage-associated molecular patterns in inflammatory diseases. *Immun. Netw.* 2018;18(4):e27. DOI: 10.4110/in.2018.18.e27.
24. Locke M., Francis R.J., Tsaousi E., Longstaff C. Fibrinogen protects neutrophils from the cytotoxic effects of histones and delays neutrophil extracellular trap formation induced by ionomycin. *Sci. Rep.* 2020;10(1):11694. DOI: 10.1038/s41598-020-68584-0.
25. Alexeyev M., Shokolenko I., Wilson G., LeDoux S. The maintenance of mitochondrial DNA integrity—critical analysis and update. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2013;5(5):a012641. DOI: 10.1101/cshperspect.a012641.

Вклад авторов

Новиков Д.Г., Золотов А.Н. – разработка концепции и дизайна. Птухин А.О., Романова М.А. – подбор клинической базы для анализа, клиническое обследование пациентов. Романова М.А. – трактовка результатов МСКТ. Золотов А.Н. – люминесцентная микроскопия. Кириченко Н.А. – обеспечение преаналитического этапа исследования, люминесцентная микроскопия. Новиков Д.Г. – ИФА-исследование сыворотки крови. Новиков Д.Г., Золотов А.Н. – анализ и интерпретация данных. Индутный А.В. – обоснование рукописи или проверка критически важного интеллектуального содержания. Мордык А.В. – окончательное утверждение для публикации рукописи.

Информация об авторах

Новиков Дмитрий Георгиевич – канд. мед. наук, доцент, доцент кафедры клинической лабораторной диагностики дополнительного профессионального образования (ДПО), зав. центральной научно-исследовательской лабораторией (ЦНИЛ), ОмГМУ, г. Омск, novikov.dm.omsk@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0002-4339-2222>

Золотов Александр Николаевич – канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник ЦНИЛ, доцент кафедры патофизиологии, ОмГМУ, г. Омск, azolotov@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-6775-323X>

Индутный Антон Васильевич – д-р мед. наук, доцент, зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики ДПО, ОмГМУ, г. Омск, kld-omsk@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0003-1951-5824>

Мордык Анна Владимировна – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой фтизиатрии, пульмонологии и инфекционных болезней, ОмГМУ, г. Омск, amordik@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0001-6196-7256>

Кириченко Николай Александрович – мл. науч. сотрудник, ЦНИЛ, ОмГМУ, г. Омск, honomer_1608@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-8411-0973>

Романова Мария Алексеевна – канд. мед. наук, доцент кафедры фтизиатрии, пульмонологии и инфекционных болезней, ОмГМУ, г. Омск, rmari1@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-1775-607X>

Птухин Александр Олегович – аспирант, кафедра фтизиатрии, пульмонологии и инфекционных болезней, ОмГМУ, г. Омск, ptuhin.alexandr@mail.ru, <http://orcid.org/000-0002-2830-161X>

(✉) **Кириченко Николай Александрович**, honomer_1608@mail.ru

Поступила в редакцию 12.03.2024;
одобрена после рецензирования 20.03.2024;
принята к публикации 14.05.2024