

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК НЕЙТРОФИЛОВ У ЗДОРОВЫХ ЛИЦ И БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЁЗОМ

МОРДЫК АННА ВЛАДИМИРОВНА, ORCID ID: 0000-0001-6196-7256; докт. мед. наук, профессор, заведующий кафедрой фтизиатрии, пульмонологии и инфекционных болезней, ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия, 644099, Омск, ул. Ленина, 12, тел. 8-913-649-21-10, e-mail: amordik@mail.ru
ЗОЛОТОВ АЛЕКСАНДР НИКОЛАЕВИЧ, ORCID ID: 0000-0002-6775-323X; канд. мед. наук, старший научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, доцент кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия, 644099, Омск, ул. Ленина, 12, тел. 8-913-977-77-96, e-mail: azolotov@mail.ru

НОВИКОВ ДМИТРИЙ ГЕОРГИЕВИЧ, ORCID ID: 000-0002-4339-2222; канд. мед. наук, доцент, доцент кафедры клинической лабораторной диагностики ДПО, заведующий Центральной научно-исследовательской лабораторией ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия, 644001 Омск, ул. 20 лет РККА, 15/1, тел. (3812) 37-27-25, e-mail: novikov.dm.omsk@gmail.com

РОМАНОВА МАРИЯ АЛЕКСЕЕВНА, ORCID ID: 0000-0002-1775-607X; канд. мед. наук, доцент кафедры фтизиатрии, пульмонологии и инфекционных болезней ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия, 644099, Омск, ул. Ленина, 12, тел. 8-906-992-74-24, e-mail: rmari1@mail.ru

ИНДУТНЫЙ АНТОН ВАСИЛЬЕВИЧ, ORCID ID: 0000-0003-1951-5824; докт. мед. наук, доцент, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики ДПО ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия, 644001 Омск, ул. 20 лет РККА, 15/1, тел. (3812) 37-20-51, e-mail: anton@indutny.com

КИРИЧЕНКО НИКОЛАЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ, ORCID ID: 0000-0002-8411-0973; младший научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия, 644001 Омск, ул. 20 лет РККА, 15/1, тел. (3812) 37-27-25, e-mail: honomer_1608@mail.ru

ПТУХИН АЛЕКСАНДР ОЛЕГОВИЧ, ORCID ID: 0000-0002-2830-161X; аспирант кафедры фтизиатрии, пульмонологии и инфекционных болезней ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия, 644099, Омск, ул. Ленина, 12, e-mail: ptuhin.aleksandr@gmail.com

Реферат. Введение. Формирование нейтрофилом внеклеточной ловушки (НВЛ) из ДНК (нетоз) рассматривается в качестве потенциально значимого маркера в диагностике туберкулеза. Однако данные о возрастных особенностях образования внеклеточных ловушек практически не представлены в научных публикациях. **Цель исследования.** Определить возрастные особенности нетоза у здоровых лиц и больных туберкулёзом. **Материалы и методы.** Исследовали способность нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек в 4 группах: 1) дети от 4 до 7 лет, с диагнозом первичный туберкулёзный комплекс, заболевших на территории Омской области; 2) здоровые и не инфицированные дети этого же возраста; 3) взрослые больные туберкулёзом и 4) взрослые, не болевшие туберкулёзом. Для этого стимулировали изолированную фракцию нейтрофилов из периферической крови исследуемых групп смесью бактерий (пробиотиком) в течение 30 минут. В препарате «раздавленная капля» определяли долю нейтрофильных внеклеточных ловушек и клеток, находящихся в состоянии разной степени активации. **Результаты и их обсуждение.** Возрастные особенности способности нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек характеризовались более выраженной реакцией нейтрофилов на стимулятор нетоза у детей в контрольной группе в сравнении с нейтрофилами, выделенными из крови в группе здоровых взрослых волонтеров – нейтрофилы детей ($Me=16,1$; $Q1=12,8$; $Q3=18,3$) статистически значимо интенсивнее ($p=0,0002$), чем у взрослых ($Me=8,6$; $Q1=7,1$; $Q3=10,5$), формировали нитевидные НВЛ. В группах больных туберкулёзом легких детей и взрослых реакция нейтрофилов на стимулятор нетоза была диаметрально противоположной. Нейтрофилы детей с первичным туберкулёзным комплексом, как и в контрольной группе, преимущественно формировали нитевидные НВЛ, но в большем количестве, а нейтрофилы взрослых с инфильтративной или очаговой формой с объемом поражения 2 и менее сегментов в основном формировали облаковидные ловушки, тогда как у взрослых в контроле после стимуляции преобладали нитевидные НВЛ. При этом у здоровых детей и здоровых взрослых доля облаковидных ловушек не превышала 5%. Сопоставляя данные нашего исследования с литературными данными, мы предположили, что, вероятнее всего, у детей в большей степени увеличивается экспрессия PAD4 и более выражено цитруллинирование гистона H3 в нейтрофилах в сравнении с нейтрофилами взрослых. **Выводы.** Полученные нами результаты свидетельствуют о более выраженных индуцированных стимулятором нетоза процессах *ex vivo* как у здоровых детей, так и у больных туберкулёзом в сравнении с взрослыми соответствующих групп, что необходимо учитывать при интерпретации результатов исследования способности нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек при туберкулёзе.

Ключевые слова: дети, туберкулёз, нетоз, способность нейтрофила к формированию внеклеточных ловушек, возрастные особенности, нейтрофильные внеклеточные ловушки.

Для ссылки. Мордык А.В., Золотов А.Н., Новиков Д.Г., и др. Возрастные особенности формирования внеклеточных ловушек нейтрофилов у здоровых лиц и больных туберкулёзом // Вестник современной клинической медицины. – 2023. – Т.16, вып. 6. – С. 37-45. DOI: 10.20969/VSKM.2023.16(6).37-45.

AGE-RELATED DIFFERENCES OF FORMING NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS IN HEALTHY INDIVIDUALS AND IN TUBERCULOSIS PATIENTS

MORDYK ANNA V., ORCID ID: 0000-0001-6196-7256; Dr. sc. med., Professor, Head of the Department of Phthysiology, Phthysiosurgery and Infectious Diseases, Omsk State Medical University, 12 Lenin str., 644099 Omsk, Russia, e-mail: amordik@mail.ru

ZOLOTOV ALEXANDER N., ORCID ID: 0000-0002-6775-323X; Cand. sc. med., Senior Researcher of the Central Research Laboratory, Associate Professor of the Department of Pathophysiology, Omsk State Medical University, 12 Lenin str., 644099 Omsk, Russia, e-mail: azolotov@mail.ru

NOVIKOV DMITRIJ G., ORCID ID: 000-0002-4339-2222; Cand. sc. med., Associate Professor at the Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Head of the Central Research Laboratory, Omsk State Medical University, 12 Lenin str., 644099 Omsk, Russia, e-mail: novikov.dm.omsk@gmail.com

ROMANOVA MARIYA A., ORCID ID: 0000-0002-1775-607X; Cand. sc. med., Associate Professor at the Department of Phthysiology, Phthysiosurgery and Infectious Diseases, Omsk State Medical University, 12 Lenin str., 644099 Omsk, Russia, e-mail: rmari1@mail.ru

INDUTNY ANTON V., ORCID ID: 0000-0003-1951-5824; D. Med. Sci., Associate Professor, Head of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics, including Postgraduate Training Courses, Omsk State Medical University, 15/1 20 let RSKA str., 644001 Omsk, Russia, e-mail: anton@indutny.com

KIRICHENKO NIKOLAJ A., ORCID ID: 0000-0002-8411-0973; Junior Researcher at the Central Research Laboratory, Omsk State Medical University, 15/1 20 let RSKA str., 644001 Omsk, Russia, e-mail: honomer_1608@mail.ru

PTUKHIN ALEXANDER O., ORCID ID: 0000-0002-2830-161X; Postgraduate Student at the Department of Phthysiology, Phthysiosurgery and Infectious Diseases, Omsk State Medical University, 12 Lenin str., 644099 Omsk, Russia, e-mail: ptuhin.aleksandr@gmail.com

Abstracts. Introduction. Forming a neutrophil extracellular trap (NET) from DNA (NETosis) is considered as a potentially significant marker in the diagnosis of tuberculosis. However, there is practically a lack of data regarding the age-related differences in forming extracellular traps in research publications. **Aim.** To determine the age-related differences of NETosis in healthy individuals and in tuberculosis (TB) patients. **Materials and Methods.** The ability of neutrophils to form extracellular traps was investigated in 4 groups: 1) 4-7-year-old children diagnosed with the primary tuberculosis complex, who fell ill within Omsk region; 2) healthy and uninfected children at the same age; 3) adults with tuberculosis, and 4) adults without tuberculosis. For this purpose, isolated fractions of neutrophils from peripheral blood of the groups under research were stimulated with a mixture of bacteria (probiotic) for 30 minutes. In the hanging-drop preparation, we analyzed the proportion of neutrophil extracellular traps and cells in the state of various motility degrees. **Results and Discussion.** Age-related differences in the ability of neutrophils to form extracellular traps were characterized by a more pronounced response of neutrophils to the NETosis stimulant in children in the control group in comparison with neutrophils isolated from blood in the group of healthy adult volunteers: Neutrophils of children (Me=16.1; Q1=12.8; Q3=18.3) were statistically significantly more intense ($p=0.0002$) than those of adults (Me=8.6; Q1=7.1; Q3=10.5) and formed filamentous NETs. In the groups of pediatric and adult pulmonary TB patients, the response of neutrophils to the NETosis stimulant was diametrically opposite. Neutrophils of children with primary tuberculosis complex, as of those in the control group, predominantly formed filamentous NETs, but in greater amounts, while neutrophils of adults with infiltrative or focal form and with at most 2 segments involved mainly formed cloudy NETs, whereas filamentous NETs prevailed for the adults in the control group after stimulation. At the same time, proportion of cloudy NETs did not exceed 5% in healthy children and healthy adults. Comparing the findings of our study with literature data, we hypothesized that, most likely, there is a greater increase in PAD4 expression and more pronounced histone H3 citrullination in children's neutrophils than in those of adults. **Conclusions.** Our findings indicate more pronounced ex vivo processes induced by NETosis stimulant in both groups of children (healthy individuals and TB patients) as compared to adults in the respective groups, which should be considered by the researchers interpreting the findings of the ability of neutrophils to form extracellular traps in tuberculosis.

Keywords: children, tuberculosis, NETosis, extracellular trap forming ability of neutrophils, age-related differences, neutrophil extracellular traps.

For reference: Mordyk AV, Zolotov AN, Novikov DG, et al. Age-related differences of forming neutrophil extracellular traps in healthy individuals and in tuberculosis patients. The Bulletin of Contemporary Clinical Medicine. 2023; 16(6): 37-45. DOI: 10.20969/VSKM.2023.16(6).37-45.

Введение. По оценкам специалистов, четверть населения Земли инфицирована микобактериями туберкулеза (МБТ) [1]. Несмотря на возможности современной фармакотерапии, которая за последние 70 лет претерпела значительный прогресс, туберкулез продолжает оставаться основной причиной смерти среди инфекционных заболеваний во всем мире [2, 3]. Одним из основных факторов, обуславливающих такую смертность, являются вероятные ограничения в возможностях диагностики туберкулеза и/или оценке степени его активности в результате чего ежегодно около 3 млн.

случаев туберкулеза (ТБ) диагностируются слишком поздно [4].

Диагноз активного ТБ может устанавливаться на основании визуализации МБТ при микроскопии мазка, этот метод оправдан простотой исполнения, но имеет низкую чувствительность, а также при оценке роста МБТ в культуре, что в свою очередь требует много времени [5]. Методы амплификации нуклеиновых кислот дороги, а значит непрактичны в бедных странах, вызывают трудности диагностики при низкой плотности населения [6]. Латентная туберкулезная инфекция выявляется при помощи

кожных проб, либо с помощью интерферонового теста (TB-Feron IGRA), основанных на выявлении гиперчувствительности замедленного типа на антигена МБТ [7]. На результат кожных проб может повлиять предшествующая вакцинация, инфекционные заболевания, аллергологический фон, что способствует ложноположительным результатам, а иммуносупрессия (в результате ВИЧ, подавляющей иммунный ответ терапии) – ложноотрицательным результатам [8]. На интерфероновый тест *in vitro* не влияет предшествующая вакцинация БЦЖ, его результат более объективен при наличии аллергических заболеваний, но у детей, особенно в возрасте до пяти лет, чувствительность этого теста снижена [9]. Ни кожные пробы, ни интерфероновый тест не позволяют отличить активный туберкулез от латентной туберкулёзной инфекции [10] для определения адекватного лечения. У пациента с симптомами активного ТБ (например, кашель, лихорадка, потеря веса, утомляемость) может быть положительный результат и кожных проб, и интерферонового теста, потому что у него активный ТБ или потому что у него латентная туберкулёзная инфекция и сопутствующая инфекция, не связанная с туберкулезом. Стратегия ВОЗ призывает к разработке новых диагностических тестов для более точной диагностики различных форм ТБ и для нивелирования недостатков уже существующих тестов [11].

Одними из потенциально значимых маркеров в диагностике туберкулеза являются измененные функционально-метаболические особенности нейтрофилов [12]. Недавно открытая функция нейтрофила – его способность к нетозу, т.е. свойство формировать внеклеточную ловушку из ДНК, также может рассматриваться в качестве перспективного маркера [13]. Но для правильной оценки этой функции при диагностике туберкулёза у детей необходимо учитывать, в том числе, и возрастные особенности формирования нейтрофильных внеклеточных ловушек в норме и патологии. В отечественных и зарубежных литературных источниках информации о возрастных особенностях этого процесса крайне мало, более того, эта информация представлена для узкого круга заболеваний, что не позволяет полученные другими исследователями результаты напрямую экстраполировать для правильной интерпретации результатов исследований нетоза при туберкулёзе.

Цель исследования. Определить возрастные особенности формирования нейтрофильных внеклеточных ловушек у здоровых лиц и больных туберкулёзом.

Материалы и методы. В исследовании изучали способность нейтрофилов периферической крови к формированию внеклеточных ловушек у детей от 4 до 7 лет, с диагнозом первичный туберкулёзный комплекс, заболевших на территории Омской области за период 2022-2023 год – всего 21 ребенок (1а группа исследования). За указанный период генотипическими и фенотипическими методами *Mycobacterium tuberculosis* не обнаружена ни у одного ребенка, диагноз установлен на основании иммунодиагностических проб, рентгенологических

изменений и данных эпиданамнеза. Сравнение проведено с группой детей от 4-х до 7-и лет с отрицательной реакцией на пробу с аллергеном туберкулезным (пробу Манту с 2 ТЕ), всего 30 детей (2а – группа). Критериями исключения для детей обеих групп были сопутствующие хронические заболевания (диабет, ВИЧ, иммунодефициты), недавно перенесенное острое респираторное заболевание, вакцинация с интервалом менее 1 месяца. В 1а группе медиана возраста – 4 года (Q1=4 и Q3=7), в 2а группе Me – 6 лет (Q1=4,5 и Q3=7); ($p > 0,05$). В 1а группе 10 (47,6%) мальчиков, во 2а группе – 20 (66,7%) мальчиков ($\chi^2=1,85$; $p>0,05$).

Для определения возрастных особенностей способности нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек в исследование были включены 22 взрослых пациента с ограниченным туберкулёзом легких (инфильтративная или очаговая форма с объемом поражения 2 и менее сегментов) без распада лёгочной ткани (1б - группа). Бактериовыделения у пациентов в 1б группе не выявлено, молекулярно-генетическими методами у 8 пациентов определили ДНК *Mycobacterium tuberculosis*, из них у 2 ДНК МБТ содержала мутации, характерные для множественной лекарственной устойчивости (МЛУ).

Таким образом, в 1а и в 1б группы включены пациенты с туберкулезом органов дыхания, без распада и бактериовыделения.

Контрольную группу взрослых (2б группа) составили 22 здоровых добровольца сопоставимого с группой 2а возраста. Критериями включения в группы 1б и 2б являлись: отсутствие любой вакцинации в течение 1 месяца, 10-часовое голодание, отсутствие чрезмерных физических нагрузок накануне, отсутствие сопутствующих хронических (сахарный диабет, ВИЧ-инфекция и другие иммунодефицитные состояния) и острых заболеваний, информированное согласие для участия в исследовании. Возраст больных в группах 1б и 2б был сопоставим – Me=39,8 лет по медиане (Q1=28,4 и Q3=54,7) и Me=41,3 лет (Q1=27,7 и Q3=55,4) соответственно; $p>0,05$. В группах 2а и 2б преобладали мужчины: 16 и 17 пациентов соответственно ($p>0,05$).

Для оценки способности нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек применялась методика, разработанная сотрудниками Центральной научно-исследовательской лаборатории и кафедры фтизиатрии, пульмонологии и инфекционных болезней ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России [14]. Выделение изолированной фракции нейтрофилов из венозной гепаринизированной крови проводилось не позднее 30 минут с момента взятия образцов.

Из гепаринизированной цельной крови выделяли изолированную фракцию нейтрофилов на двойном градиенте плотности фиколл-верографина. После выделения концентрацию гранулоцитов доводили до 5000 клеток на 1 мкл. В качестве стимулятора нетоза использовали пробиотик (смесь *Lactobacillus reutri*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosis* и *Bifidumbacterium longum*). Для этого образец выделенных нейтрофилов инкубировали с пробиотиком в соотношении 10 условных объемов клеточной взвеси к 1 объему про-

биотика в течение 30 мин при 37°C. В отрицательном контроле 10 объемов нейтрофилов инкубировались с 1 объемом 0,9% NaCl в течение 30 мин при 37°C. После 30 мин инкубации клетки окрашивали раствором интеркалирующего красителя пропидид и иодида и моноклональными антителами к CD15, меченными FITC. Готовили ex tempore препарат «раздавленная капля» и с помощью люминесцентной микроскопии подсчитывали процентное отношение клеток, находящихся на различных стадиях процесса образования нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) или не вступивших в этот процесс. В препарате определяли долю **интактных нейтрофилов** (клетки с прокрашенной цитолеммой, но без прокрашенного ядра) (рис. 1), **гипоактивированных нейтрофилов** (клетки с прокрашенной цитолеммой и слабо прокрашенным ядром), **активированных нейтрофилов** (прокрашена цитолемма и ядро обычной формы и размера) (рис. 1), **гиперактивированных нейтрофилов** (прокрашена цитолемма и увеличенное в размере ядро, которое касается цитолеммы), **клеток раннего нетоза** - гиперактивированные клетки с начальными признаками нетоза с поверхностными структурами ярко-зеленого цвета и увеличенным в размере красно-оранжевым ядром с визуализируемым выходом ядерного вещества хотя бы в одной локации, но не окружающее клетку со всех сторон (рис. 1), **облаковидных НВЛ** (рис. 1) (неструктурированная ДНК располагалась вокруг нейтрофила) и **нитевидных НВЛ** ловушка с нитчато-сетчатой структурой, превышающая размер нейтрофила в несколько раз (рис. 1). Дополнительно рассчитывали **коэффициент захвата НВЛ** – отношение общего числа фиксированных в НВЛ бактерий, входящих в

пробиотик, к суммарному количеству НВЛ (облаковидных и нитевидных) в препарате.

Члены Этического комитета ФГБОУ ВО Омский государственный университет рассмотрели пакет документов и дали разрешение на проведение исследования, выполняемого в рамках научного проекта №23-25-10043 (грант РНФ) конкурс №65 на тему «Вклад нейтрофильных внеклеточных ловушек в патогенез и прогноз первичной туберкулезной инфекции у детей на материалах региона с сохраняющейся заболеваемостью детским туберкулезом (Омская область)». Принято единогласно, выписка из протокола №5 от 28.04.2023.

Для статистической обработки данных использовалась программа STATISTICA v 6.0. Проверку на нормальность распределения количественных переменных проводили с использованием теста Шапиро – Уилка (W). Количественные данные представлены в формате медианы (Me) и межквартильного размаха (Q1 – Q3), минимального и максимального значения (Мин. – Макс.). При сравнении двух независимых групп наблюдений использовался U-тест Манна – Уитни, для качественных данных использован критерий χ^2 . Статистически значимыми считали различия в сравниваемых группах при достигнутом уровне статистической значимости менее 0,05 ($p < 0,05$).

Результаты и их обсуждение.

Содержание НВЛ и клеток раннего нетоза в препарате изолированных нейтрофилов после воздействия стимулятором нетоза у здоровых лиц и больных туберкулезом

После воздействия стимулятора нетоза нейтрофилы всех исследуемых групп (1а, 1б, 2а, 2б) формировали облаковидные и нитевидные НВЛ (рис. 2). В группах больных туберкулезом (1а и 1б), как у детей, так и у взрослых, нейтрофилы после стимуляции формировали НВЛ интенсивнее, чем нейтрофилы контрольных групп (2а и 2б). В частности, в препарате нейтрофилов у детей больных туберкулезом (группа 1а) облаковидных ловушек (Me=12,6; Q1=9,3; Q3=14,8) было статистически значимо выше ($p=0,0076$) относительно их доли в препарате контрольной (2а) группы (Me=4,9; Q1=4,3; Q3=7,2), а в группе взрослых, больных туберкулезом (группа 1б) доля облаковидных ловушек (Me=24,4; Q1=18,6; Q3=27,5) в препарате после стимуляции нейтрофилов была статистически значимо выше ($p=0,00005$) относительно контрольной (2б) группы (Me=4,8; Q1=4,0; Q3=7,1) (рис. 2). После стимуляции нейтрофилы в 1а группе формировали нитевидные ловушки на 29,2% интенсивнее, чем нейтрофилы в группе 2а, медиана и межквартильный диапазон в этих группах составили Me=20,8 (Q1=16,5; Q3=21,6) и Me=16,1 (Q1=12,8; Q3=18,3) соответственно, а уровень статистической значимости различий (p) – 0,0046 (рис. 2). Различий в содержании нитевидных НВЛ в препаратах нейтрофилов после стимуляции в группах 1б и 2б выявлено не было. Процент клеток раннего нетоза в препаратах больных туберкулезом детей (1а группа) и взрослых (1б группа) был статистически значимо выше, чем в соответствующих контрольных группах, уровень статистической

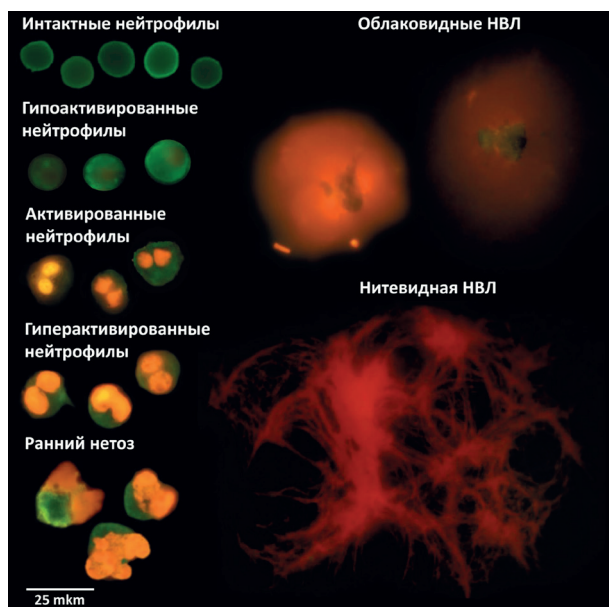


Рисунок 1. Примеры визуализируемых НВЛ и клеток разной степени активации в препарате изолированных нейтрофилов до стимуляции и после стимуляции пробиотиком.

Figure 1. Examples of visualized NETs and cells of different degrees of activation in a preparation of isolated neutrophils before stimulation and after probiotic stimulation.

значимости различий составил – 0,0291 и 0,0015 соответственно (рис. 2). Показатель «коэффициент захвата объектов на 1 сеть» не продемонстрировал статистически значимых различий между исследуемыми контрольными группами и группами больных туберкулёзом (рис. 2).

Таким образом, способность нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек больных туберкулёзом детей с первичным туберкулезным комплексом и взрослых была выше, чем у здоровых детей и взрослых.

Возрастные особенности формирования НВЛ

Выявлены возрастные особенности в формировании НВЛ нейтрофилами, как в контроле, так и в патологии. При сравнении содержания НВЛ в препарате нейтрофилов после воздействия стимулятора нетоза между детьми и взрослыми отмечались статистически значимые различия в содержании как облаковидных, так и нитевидных НВЛ (рис. 2). При сравнении групп 2а и 2б выявлено, что нейтрофилы здоровых детей (группа 2а) формировали нитевидные НВЛ статистически значимо ($p=0,0002$) интенсивнее, чем нейтрофилы здоровых взрослых

волонтеров (2б группа), а при сравнении групп 1а и 1б выявлено, что после воздействия стимулятора нетоза доля нитевидных ловушек у детей больных туберкулёзом (группа 1а) была статистически значимо ($p=0,0131$) выше, чем у взрослых больных туберкулёзом (группа 1б) (рис. 2). Нейтрофилы взрослых пациентов больных туберкулёзом (группа 1б) статистически значимо ($p=0,0188$) чаще формировали облаковидные НВЛ в сравнении с нейтрофилами детей больных туберкулёзом (группа 1а) (рис. 2). Различий в содержании облаковидных НВЛ в препарате изолированной фракции нейтрофилов после стимуляции нейтрофилов в 2а и 2б группах не выявлено (рис. 2). Различий в содержании клеток раннего нетоза между группами детей и взрослых в препаратах здоровых лиц и больных туберкулёзом не было (рис. 2).

Таким образом, нейтрофилы взрослых пациентов больных туберкулёзом легких чаще формировали облаковидные НВЛ, а нейтрофилы детей с первичным туберкулезным комплексом – чаще формировали нитевидные НВЛ (рис. 3). При этом особенность возрастной реактивности нейтрофилов

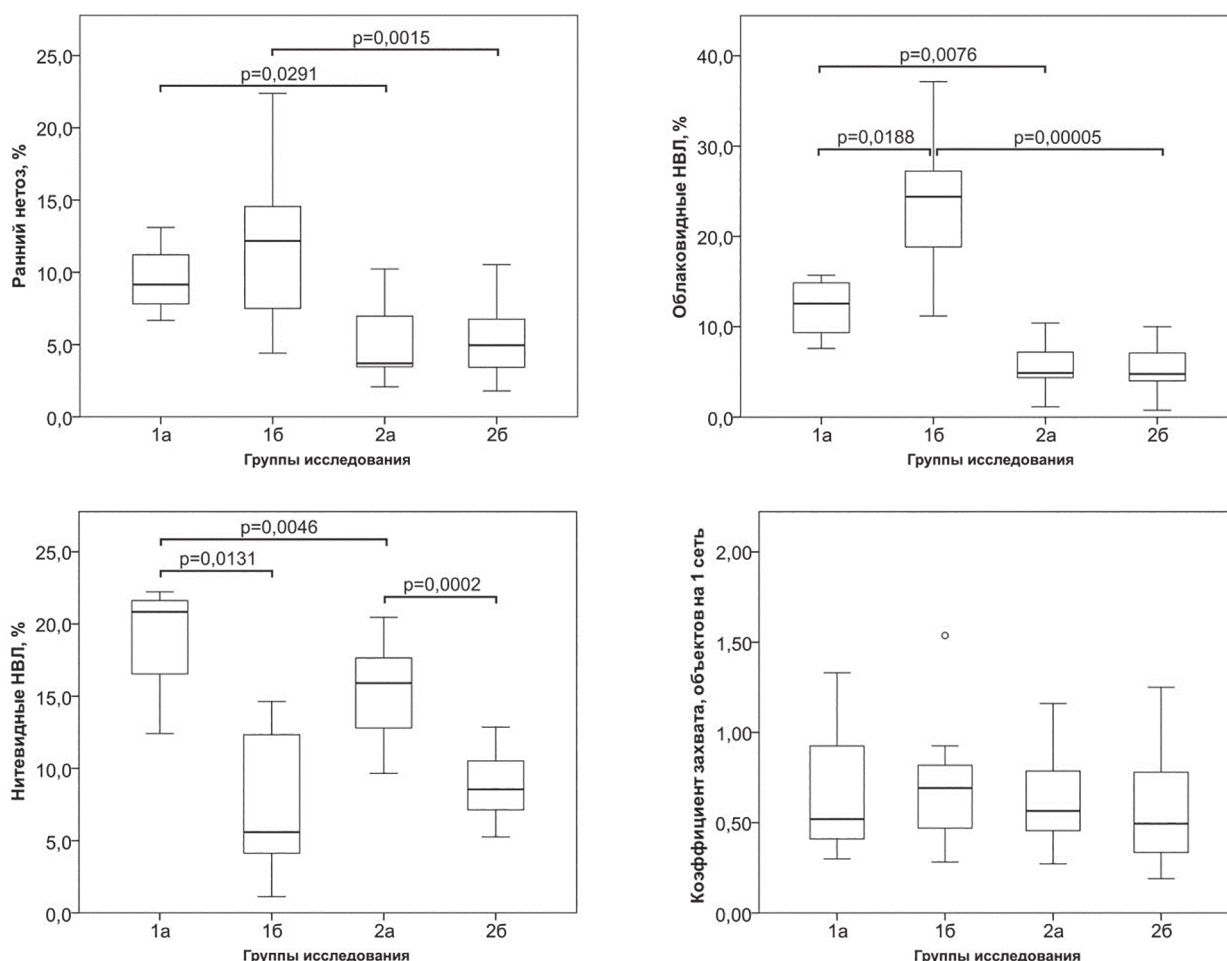


Рисунок 2. Доля клеток раннего нетоза, облаковидных НВЛ, нитевидных НВЛ и коэффициент захвата НВЛ после воздействия стимулятора нетоза в ex vivo препарате изолированной фракции нейтрофилов, выделенных из периферической крови больных туберкулёзом (детей и взрослых) и здоровых детей и взрослых
 Figure 2. Proportion of early NETosis, cloudy NETs, filamentous NETs and NET capture ratio after exposure to NETosis stimulant in ex vivo preparation of isolated fraction of neutrophils isolated from peripheral blood of TB patients (children and adults) and healthy children and adults

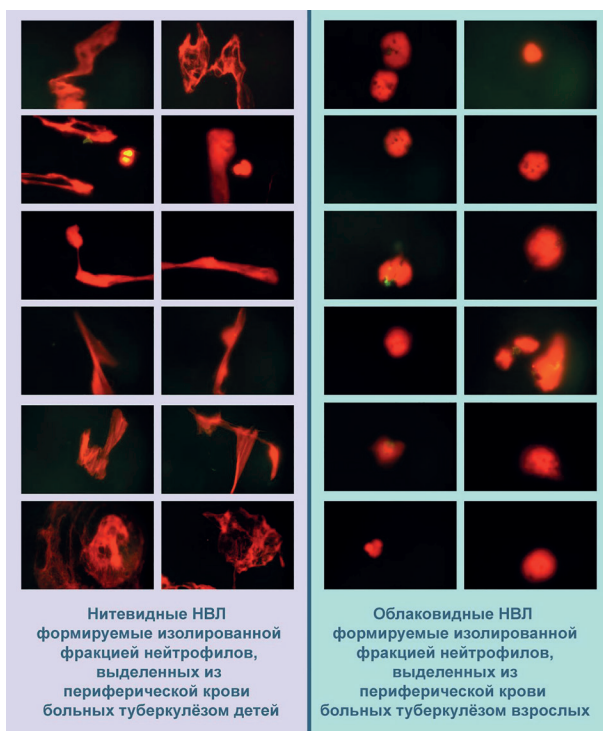


Рисунок 3. Примеры нитевидных НВЛ, преимущественно формируемых нейтрофилами детей с первичным туберкулезным комплексом и облаковидных НВЛ, преимущественно формируемых нейтрофилами взрослых больных туберкулёзом
 Figure 3. Examples of filamentous NETs predominantly formed by neutrophils of children with primary tuberculosis complex and cloudy NETs predominantly formed by neutrophils of adult TB patients

в норме заключалась в более интенсивной реакции нейтрофилов детей на стимулятор нетоза в контексте формирования нитевидных НВЛ в сравнении со здоровыми взрослыми волонтерами. Важно отметить, что и у детей, и у взрослых медиана доли облаковидных НВЛ в норме не превышала 5%.

Содержание клеток в препарате изолированных нейтрофилов после воздействия стимулятора нетоза у здоровых лиц и больных туберкулёзом

В группах больных туберкулезом (1а и 1б группы) после стимуляции нейтрофилов снижалось процентное отношение интактных нейтрофилов в сравнении с процентом интактных нейтрофилов в препаратах контрольных групп (рис. 4). Так, в группе детей больных туберкулезом (группа 1а) интактных нейтрофилов (Me=43,2; Q1=38,2; Q3=45,6) в препарате после стимуляции было статистически значимо меньше (p=0,0053), чем в 2а группе (Me=54,9; Q1=51,4; Q3=58,3). У взрослых пациентов с туберкулезом (1б группа) доля интактных нейтрофилов в препарате после стимуляции составила Me=40,3 (Q1=34,2; Q3=44,6), что в сравнении с показателем 2б группы (Me=58,6; Q1=50,9; Q3=64,6) было статистически значимо ниже (p=0,0001) (рис. 4). После стимуляции в 1а и 1б группах значимо реже встречались гипоактивированные нейтрофилы в сравнении с контрольными группами (2а и 2б группы), уровень статистической значимости составил

у детей – 0,0109, а у взрослых – 0,0097 (рис. 4). Статистически значимых различий в содержании интактных и гипоактивированных нейтрофилов между взрослыми и детьми в контрольных группах и группах больных туберкулёзом выявлено не было. В группе 2б (Me=12,3; Q1=7,2; Q3=17,6) доля активированных нейтрофилов в препарате после стимуляции была статистически значимо выше (p=0,0377) в сравнении с 2а группой (Me=7,3; Q1=2,4; Q3=10,4) (рис. 4). После стимуляции изолированной фракции нейтрофилов доля гиперактивированных нейтрофилов в 1а группе была выше (p=0,0153) в сравнении с 2а группой, и в 1б группе значимо выше (p=0,0023) в сравнении с 2б группой. Статистически значимых различий в содержании гиперактивированных нейтрофилов между группами взрослых и детей в препарате после воздействия стимулятора нетоза выявлено не было (рис. 4).

Таким образом, возрастные особенности способности нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек характеризовались более выраженной реакцией нейтрофилов на стимулятор нетоза у детей в контрольной группе в сравнении с нейтрофилами, выделенными из крови в группе здоровых взрослых волонтеров – нейтрофилы детей интенсивнее, чем у взрослых, формировали нитевидные НВЛ. В группах больных туберкулезом легких детей и взрослых реакция нейтрофилов на стимулятор нетоза была диаметрально противоположной. Нейтрофилы детей с первичным туберкулезным комплексом, как и в контрольной группе, преимущественно формировали нитевидные НВЛ, но в большем количестве, а нейтрофилы взрослых с инфильтративной или очаговой формой с объемом поражения 2 и менее сегментов в основном формировали облаковидные НВЛ, тогда как у взрослых в контроле после стимуляции пробиотиком преобладали нитевидные НВЛ, а медиана доли облаковидных НВЛ была сопоставима с показателями контрольной группы детей и не превышала 5%.

Показано, что при туберкулезной инфекции в нейтрофильных лейкоцитах повышается генерация активных форм кислорода [15]. Данный процесс в первую очередь обусловлен активацией НАДФН-оксидазы [16]. Также имеются сведения об усиленной генерации митохондриального пула АФК в фагоцитировавших МБТ-макрофагах, что связано с усилением обратного транспорта электронов в ответ на воздействие TNF-α [17]. Возможно, аналогичный процесс происходит и в нейтрофильных лейкоцитах. Известно, что активация НАДФН-оксидазы и генерация АФК являются ведущими событиями, которые необходимы для запуска суицидального и митохондриального механизмов нетоза [18]. Тем не менее, нетоз является высококонтролируемым процессом, результатом которого может быть гибель клетки или высвобождение внеклеточной ловушки. Эти оба процесса во многом зависят от стимулов, которые действуют на нейтрофил. Например, форбол-12-мирикат-13-ацетат или кристаллы холестерина, вызывают поздний (суицидальный) нетоз через АФК-зависимый механизм [19], а рецепторы комплемента, лиганды толл-подобных рецепторов 2 и 4

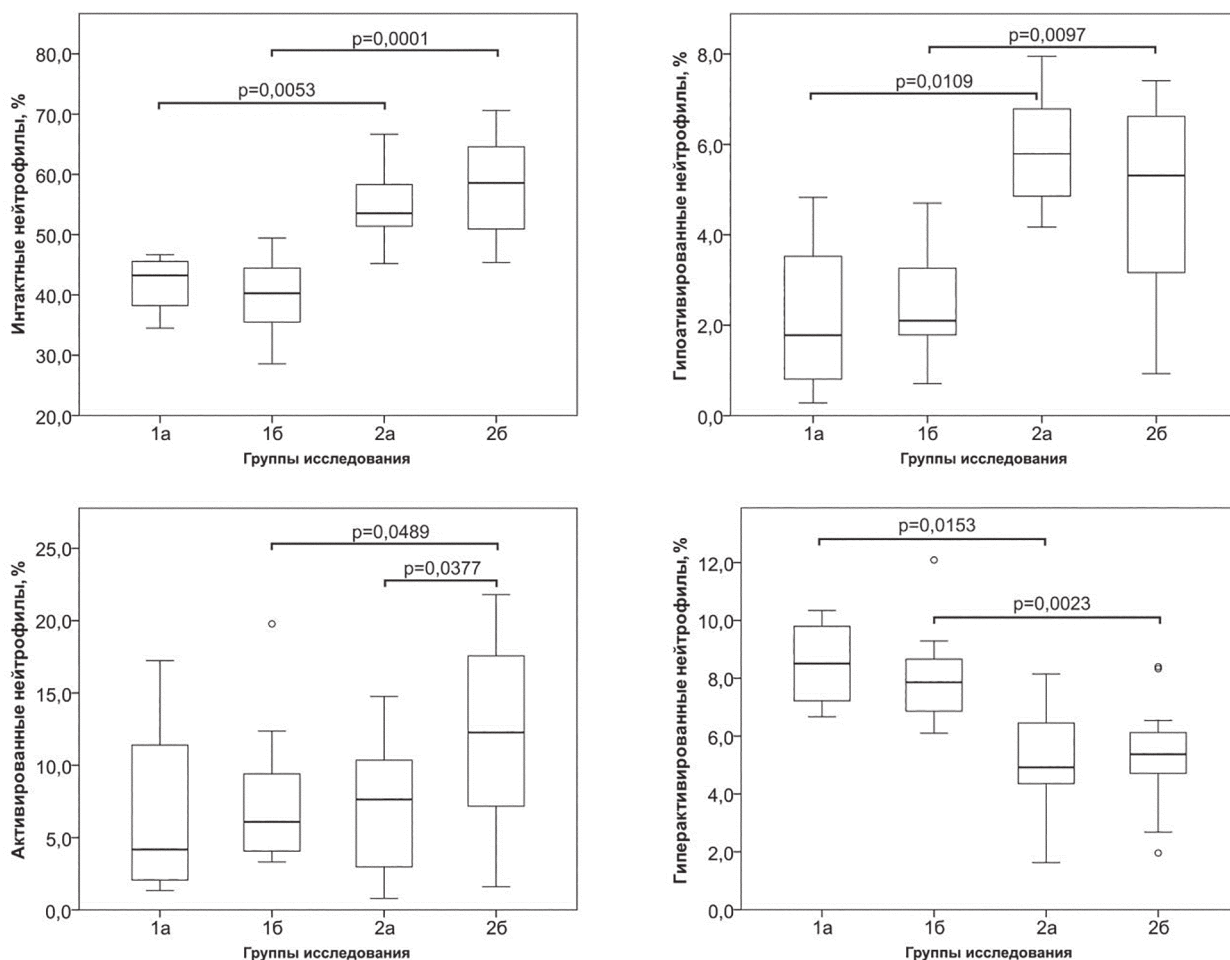


Рисунок 4. Доля интактных нейтрофилов и нейтрофилов разной степени активации после воздействия стимулятора нетоза в ex vivo препарате изолированной фракции нейтрофилов выделенных из периферической крови больных туберкулёзом (детей и взрослых) и здоровых детей и взрослых
 Figure 4. Proportion of intact neutrophils and neutrophils of different degrees of activation after exposure to NETosis stimulant in ex vivo preparation of isolated fraction of neutrophils isolated from peripheral blood of TB patients (children and adults) and healthy children and adults

(TLR2/TLR4) или активированные TLR4 тромбоциты вызывают витальный нетоз через АФК-независимый механизм, но, в конечном итоге, оба процесса зависят от активации фермента пептидил-аргинин деиминазы 4 типа (PAD4) [19, 20]. Ранее было показано, что с возрастом в сетчатке мыши снижается экспрессия и цитруллинирование как PAD2, так и PAD4. В частности, максимум активности PAD4 у мышей наблюдался через 2-4 недели после рождения (что соответствует возрасту детей у человека), быстро снижаясь в возрасте 6-8 недель, т.е. в возрасте, который соответствует возрасту взрослого человека [21]. Таким образом, можно предположить, что, вероятнее всего, активность PAD4, которая у детей выше в сравнении с взрослыми, определяет повышенную реактивность нейтрофила у детей в контексте формирования им НВЛ.

Тот факт, что нетоз может быть более выражен у детей, подтверждает исследование вызванной боррелиями и нейротропными вирусами патологии ЦНС у детей и взрослых. В этом исследовании показано, что активация нейтрофилов и выраженное

образование НВЛ происходят интенсивнее в образцах спинномозговой жидкости детей в сравнении с образцами взрослых [22]. В экспериментальном исследовании Colon D.F. с соавт. на мышах после моделирования сепсиса и ЛПС-индуцированной эндотоксемии определялся высокий уровень НВЛ, который у новорожденных мышей был значительно выше, чем у взрослых особей [23]. Более того, в сравнении с взрослыми мышами нетоз у новорожденных мышей сопровождался усилением выработки провоспалительных цитокинов и значительным повреждением органов, а повышение уровня НВЛ было связано с увеличением экспрессии PAD4 и усилением цитруллинирования гистона H3 в нейтрофилах [23].

Результаты нашего исследования продемонстрировали, что при туберкулезе у детей способность нейтрофила к формированию нитевидных НВЛ сохранялась. Однако у взрослых с ограниченным туберкулёзом легких (инфильтративная или очаговая форма с объемом поражения 2 и менее сегментов) без распада лёгочной ткани нейтрофилы при стиму-

ляции их *in vitro* формировали преимущественно не нитевидные НВЛ, а облаковидные. Облаковидные НВЛ в отличие от нитевидных характерны для иммунопатологических процессов [24], а значит, преобладание облаковидного нетоза над нитевидным у взрослых можно объяснить сочетанием незавершенного фагоцитоза, характерного для специфического воспаления при туберкулезе, со сниженной активностью PAD4.

Выводы. В совокупности полученные нами результаты свидетельствуют о более выраженных процессах нетоза как у здоровых детей, так и у больных туберкулезом в сравнении с взрослыми соответствующих групп в ответ на воздействие стимулятора нетоза на изолированную фракцию нейтрофилов. Этот факт необходимо учитывать при интерпретации результатов исследования индуцированного *in vitro* нетоза в норме и при туберкулезной инфекции.

Прозрачность исследования. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать.

Декларация о финансовых и других взаимоотношениях

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

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Houben RM, Dodd PJ. The Global Burden of Latent Tuberculosis Infection: A Re-estimation Using Mathematical Modelling. *PLoS Med.* 2016 Oct 25;13(10):e1002152. DOI: 10.1371/journal.pmed.1002152
2. Яблонский П.К., Старшинова А.А., Назаренко М.М., и др. Повышение эффективности лечения больных туберкулезом легких с применением новых схем терапии // Вестник современной клинической медицины. – 2022. – Т. 15, № 2. – С. 67-75. [Yablonsky PK, Starshinova AA, Nazarenko MM, et al. Povyshenie jeffektivnosti lechenija bol'nyh tuberkulezom legkih s primeneniem novyh shem terapii [Increasing the efficiency of patients with pulmonary tuberculosis treatment with the use of new therapy regimens]. *Vestnik sovremennoy klinicheskoy meditsiny* [The Bulletin of Contemporary Clinical Medicine]. 2022; 15(2): 67-75. (In Russ.)]. DOI 10.20969/VSKM.2022.15(2).67-75
3. Furin J, Cox H, Pai M. Tuberculosis. *Lancet.* 2019 Apr 20;393(10181):1642-1656. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)30308-3
4. Denkinger CM, Kik SV, Cirillo DM, et al. Defining the needs for next generation assays for tuberculosis. *J Infect Dis.* 2015 Apr 1;211 Suppl 2(Suppl 2):S29-38. DOI: 10.1093/infdis/jiu821
5. Tebruegge M, Ritz N, Curtis N, et al. Diagnostic Tests for Childhood Tuberculosis: Past Imperfect, Present Tense and Future Perfect? *Pediatr Infect Dis J.* 2015 Sep;34(9):1014-9. DOI: 10.1097/INF.0000000000000796
6. Liu HC, Gao YL, Li DF, et al. Value of Xpert MTB/RIF Using Bronchoalveolar Lavage Fluid for the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis: a Systematic Review and Meta-analysis. *J Clin Microbiol.* 2021 Mar 19;59(4):e02170-20. DOI: 10.1128/JCM.02170-20
7. Zhou G, Luo Q, Luo S, et al. Interferon- γ release assays or tuberculin skin test for detection and management of latent tuberculosis infection: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2020 Dec;20(12):1457-1469. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30276-0
8. Yang H, Kruh-Garcia NA, Dobos KM. Purified protein derivatives of tuberculin—past, present, and future. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012 Dec;66(3):273-80. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2012.01002.x
9. Tebruegge M, Clifford V, Curtis N. Interferon-gamma Release Assays Should Not Replace Tuberculin Skin Tests in Screening Programs for Children. *Pediatr Infect Dis J.* 2016 Aug;35(8):929. DOI: 10.1097/INF.0000000000001195
10. Pai M. Spectrum of latent tuberculosis - existing tests cannot resolve the underlying phenotypes. *Nat Rev Microbiol.* 2010 Mar;8(3):242; author reply 242. DOI: 10.1038/nrmicro2236-c1
11. Kanchar A, Swaminathan S. Tuberculosis Control: WHO Perspective and Guidelines. *Indian J Pediatr.* 2019 Aug;86(8):703-706. DOI: 10.1007/s12098-019-02989-2
12. Сабадаш Е.В., Скорняков С.Н., Павлов В.А., и др. Активные формы кислорода и высокоактивные соединения азота лейкоцитов крови в механизмах защиты и повреждения при туберкулезе легких // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2016. – Т. 60, № 4. – С. 101-106. [Sabadash EV, Skorniakov SN, Pavlov VA, et al. Aktivnye formy kisloroda i vysokoaktivnye soedinenija azota lejkcitov krovi v mehanizmah zashhity i povrezhdenija pri tuberkuleze legkih [Reactive oxygen species and high-nitrogen compound in the mechanism of protection and damage in white blood cells in pulmonary tuberculosis]. *Patologicheskaja fiziologija i jeksperimental'naja terapija* [Pathological physiology and experimental therapy]. 2016; 60(4): 101-106. (In Russ.)].
13. Мордык А.В., Золотов А.Н., Новиков Д.Г., и др. Нетозформирующая способность нейтрофилов у пациентов с ограниченным и распространенным туберкулезным процессом // Туберкулез и болезни легких. – 2023. – Т. 101, № 3. – С. 78-86. [Mordyk AV, Zolotov AN, Novikov DG, et al. Netozformirujushhaja sposobnost' nejtrofilov u pacientov s ogranichennym i rasprostranennym tuberkuleznym processom [NETosis-forming ability of neutrophils in patients with limited and disseminated tuberculous lesions]. *Tuberkulez i bolezni legkih* [Tuberculosis and Lung Diseases]. 2023; 101(3): 78-86. (In Russ.)]. DOI 10.58838/2075-1230-2023-101-3-78-86
14. Патент № 2768152 С1 Российская Федерация, МПК G01N 33/569, G01N 33/533, G01N 33/577. Способ обнаружения нейтрофильных внеклеточных ловушек в суправитально окрашенном препарате крови: № 2021129097: заявл. 06.10.2021: опублик. 23.03.2022 / Д.Г. Новиков, А.Н. Золотов, Н.А. Кириченко, А.В. Мордык; заявитель федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. – 20 с.: ил. – Текст: непосредственный. [Patent No 2768152 C1 Russian Federation, IPC G01N 33/569, G01N 33/533, G01N 33/577. Spособ obnaruzhenija nejtrofil'nyh vnekletochnyh lovushek v supravital'no okrashennom preparate krovi [Method for detection of neutrophil extracellular traps in supravital stained blood preparation]: No. 2021129097: pending 06.10.2021: published 23.03.2022 / Novikov DG, Zolotov

- AN, Kirichenko NA, Mordyk AV; Applicant Omsk State Medical University. – 20 p.: fig. – Text: direct. (In Russ.)].
15. Yang S, Ouyang J, Lu Y, et al. A Dual Role of Heme Oxygenase-1 in Tuberculosis. *Front Immunol.* 2022 Feb 25;13:842858. DOI: 10.3389/fimmu.2022.842858
 16. Nguyen GT, Green ER, Meccas J. Neutrophils to the ROScue: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017 Aug 25;7:373. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00373
 17. Roca FJ, Whitworth LJ, Prag HA, et al. Tumor necrosis factor induces pathogenic mitochondrial ROS in tuberculosis through reverse electron transport. *Science.* 2022 Jun 24;376(6600):eabh2841. DOI: 10.1126/science.abh2841
 18. Huang SU, O'Sullivan KM. The Expanding Role of Extracellular Traps in Inflammation and Autoimmunity: The New Players in Casting Dark Webs. *Int J Mol Sci.* 2022 Mar 30;23(7):3793. DOI: 10.3390/ijms23073793
 19. Jorch SK, Kubes P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat Med.* 2017 Mar 7;23(3):279-287. DOI: 10.1038/nm.4294
 20. Li P, Li M, Lindberg MR, et al. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med.* 2010 Aug 30;207(9):1853-62. DOI: 10.1084/jem.20100239
 21. Hollingsworth TJ, Radic MZ, Beranova-Giorgianni S, et al. Murine Retinal Citrullination Declines With Age and is Mainly Dependent on Peptidyl Arginine Deiminase 4 (PAD4). *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2018 Aug 1;59(10):3808-3815. DOI: 10.1167/iovs.18-24118
 22. Appelgren D, Enocsson H, Skogman BH, et al. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in the Cerebrospinal Fluid Samples from Children and Adults with Central Nervous System Infections. *Cells.* 2019 Dec 23;9(1):43. DOI: 10.3390/cells9010043
 23. Colón DF, Wanderley CW, Franchin M, et al. Neutrophil extracellular traps (NETs) exacerbate severity of infant sepsis. *Crit Care.* 2019 Apr 8;23(1):113. DOI: 10.1186/s13054-019-2407-8
 24. Yousefi S, Simon HU. NETosis - Does It Really Represent Nature's "Suicide Bomber"? *Front Immunol.* 2016 Aug 26;7:328. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00328