

СПОСОБНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ К ФОРМИРОВАНИЮ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК EX VIVO И УРОВЕНЬ ЦИТРУЛЛИНИРОВАННОГО ГИСТОНА H3 В КРОВИ В ПРОЦЕССЕ ПРОВЕДЕНИЯ ПРЕВЕНТИВНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ ПРИ ЛАТЕНТНОЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

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

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

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

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

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: rmar1@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. Оценка изменений в клеточном звене врождённого иммунитета может усилить информативность подходов к диагностике латентной туберкулёзной инфекции. Процесс формирования нейтрофильных внеклеточных ловушек – нетоз, описан относительно недавно и в научных публикациях нет сведений об изменении способности нейтрофилов к нетозу в процессе превентивной химиотерапии при латентной туберкулёзной инфекции. **Цель.** Определить способность нейтрофилов периферической крови к формированию внеклеточных ловушек ex vivo, содержание цитруллинированного гистона H3, пептидил–аргинин деиминазы 4, динамин–подобного белка–1, интерлейкинов 1 и 8 в крови после 6–месячного курса превентивной химиотерапии латентной туберкулёзной инфекции у детей. **Материалы и методы.** Исследовали способность нейтрофилов периферической крови к формированию внеклеточных ловушек после воздействия неспецифического антигенного стимулятора и концентрации цитруллинированного гистона H3, PAD4, динамин–подобного белка–1, интерлейкинов 1 и 8 в крови. В группу 1 («Контроль»), вошли 30 здоровых детей с отрицательной реакцией на туберкулин. В группу 2 вошли 27 детей с латентной туберкулёзной инфекцией при положительной пробе с аллергеном туберкулёзным рекомбинантным. В этой группе все исследования проводились в двух исследовательских точках: точка 1 – на момент первичного выявления инфекции, точка 2 – через 6 мес. после начала превентивной химиотерапии.

Результаты и их обсуждение. Способность нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек в группе 2, точке 1 была значимо выше в сравнении с группой «Контроль», при этом нейтрофилы, чаще формировали нитевидные ловушки ($p=0,0419$). После проведения превентивной химиотерапии (2–я точка) наблюдали снижение доли нитевидных ловушек ($p=0,0357$), до уровня группы контроль ($p=0,0724$). Содержание цитруллинированного гистона H3 в крови больных из группы 2 на точке 1 составило $Me=5,60$ ($Q1=2,80$; $Q3=12,00$) и было статистически значимо выше ($p=0,0002$) в сравнении со значениями группы «Контроль» – $Me=1,41$ ($Q1=0,91$; $Q3=1,78$). В процессе превентивной химиотерапии концентрация анализата снизилась – $Me=1,20$ ($Q1=0,90$; $Q3=1,50$), достигнув значений, не отличавшихся от наблюдавшихся в группе «Контроль». Исследование концентрации PAD4, динамин–подобного белка–1, интерлейкинов 1 и 8 в крови не выявило статистически значимых различий между исследуемыми группами. **Выводы.** В процессе превентивной химиотерапии латентной туберкулёзной инфекции на фоне достижения положительных клинических результатов наблюдалась нормализация способности нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек – снижалась доля нитевидных ловушек. Снижение содержания цитруллинированного гистона H3 в крови вероятно, указывало на ослабление интенсивности нетоза. Данные показатели можно рассматривать, как вероятные и перспективные маркёры достижения положительного результата химиотерапии латентной туберкулёзной инфекции.

Ключевые слова: дети, латентная туберкулёзная инфекция, превентивная химиотерапия, нетоз, нейтрофильные внеклеточные ловушки, биомаркеры нетоза.

Для ссылки: Новиков Д.Г., Золотов А.Н., Мордык А.В., [и др.]. Способность нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек *ex vivo* и уровень цитруллинированного гистона H3 в крови в процессе проведения превентивной химиотерапии при латентной туберкулезной инфекции // Вестник современной клинической медицины. – 2024. – Т. 17, вып. 5. – С.54–63. DOI: 10.20969/VSKM.2024.17(5).54-63.

NEUTROPHILS' ABILITY TO FORM NETS EX VIVO AND THE CITRULLINATED HISTONE H3 LEVELS IN BLOOD DURING THE PREVENTIVE CHEMOTHERAPY OF LATENT TUBERCULOSIS INFECTION

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

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

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

INDUTNY ANTON V., ORCID ID: 0000–0003–1951–5824; *Dr. sc. med., Associate Professor, Head of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics, including Postgraduate Training Courses, Omsk State Medical University, 15/1 20 let RKKA 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 RKKA str., 644001 Omsk, Russia.* E-mail: honomer_1608@mail.ru

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

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

Abstract. Introduction. Assessment of changes in the cellular link of innate immunity can enhance the informativeness of approaches to the diagnosis of latent tuberculosis infection. The process of forming neutrophil extracellular traps, NETosis, was described relatively recently, and there is no information in scientific publications about changes in neutrophils' NETosis ability during preventive chemotherapy in latent tuberculosis infection. **Aim.** To determine the ability of peripheral blood neutrophils to form extracellular traps *ex vivo*, and the contents of citrullinated histone H3, PAD4, dynamin-like protein-1, and interleukins 1 and 8 in blood after a 6-month course of preventive chemotherapy for latent tuberculosis infection in children. **Materials and Methods.** Peripheral blood neutrophils' ability to form extracellular traps after exposure to a nonspecific antigenic stimulant was studied, as well as the concentrations of citrullinated histone H3, Peptidyl arginine deiminase 4, dynamin-like protein-1, and interleukins 1 and 8 in blood. Group 1 ("Control") included 30 healthy children with negative tuberculin reaction to tuberculin. Group 2 included 27 children with latent tuberculosis infection, having a positive tuberculosis recombinant allergen test reaction. In this group, all studies were performed at two study points: Point 1 – at the time of initial detection of the infection, point 2 – 6 months after the start of preventive chemotherapy. **Results and Discussion.** Neutrophils' ability to form extracellular traps in Group 2 at Point 1 was significantly higher compared to that in the Control Group, with neutrophils more often forming filamentous traps ($p=0.0419$). After preventive chemotherapy (Point 2), we observed a decrease in the proportion of thread traps ($p=0.0357$) to the level of the Control Group ($p=0.0724$). The content of citrullinated histone H3 in the blood of patients from Group 2 at Point 1 was $Me=5.60$ ($Q1=2.80$; $Q3=12.00$) and, statistically, significantly higher ($p=0.0002$) as compared to the values of the Control Group: $Me=1.41$ ($Q1=0.91$; $Q3=1.78$). In preventive chemotherapy, the analyte concentration decreased: $Me=1.20$ ($Q1=0.90$; $Q3=1.50$), reaching the values that did not differ from those observed in the Control Group. Examining the concentrations of PAD4, dynamin-like protein-1, and interleukins 1 and 8 in blood did not reveal statistically significant differences between the groups studied. **Conclusions.** In the preventive chemotherapy of latent tuberculosis infection against the background of achieving positive clinical results, normalization of neutrophils' ability to form extracellular traps was observed, and the proportion of filamentous traps decreased. Decrease in the citrullinated histone H3 content in the blood probably indicated weakening of the intensity of nephrosis. These indicators can be considered as probable and promising markers of the positive results of the chemotherapy of latent tuberculosis infection. **Keywords:** children, latent tuberculosis infection, preventive chemotherapy, NETosis, neutrophil extracellular traps, NETosis biomarkers

For reference: Novikov DG, Zolotov AN, Mordyk AV, et al. Neutrophils' ability to form NETs *ex vivo* and the citrullinated histone H3 levels in blood during the preventive chemotherapy of latent tuberculosis infection. The Bulletin of Contemporary Clinical Medicine. 2024; 17 (5): 54-63. DOI: 10.20969/VSKM.2024.17(5).54-63.

Введение. Туберкулез (ТБ) – это инфекционное заболевание, вызываемое *Mycobacterium tuberculosis*, которые распространяются воздушно-капельным путем. Заболевание обычно развивается в легких, но могут быть поражены и другие органы и системы [1]. В настоящее время в мире зарегистрировано около 25 % случаев латентной формы туберкулеза (ЛТИ) [2]. Хотя пациенты с латентной туберкулезной инфекцией не имеют клинических симптомов, у 5–10 % из них может развиться активный ТБ [3]. Одним из направлений «Стратегии по ликвидации туберкулеза», разработанной Всемир-

стрировано около 25 % случаев латентной формы туберкулеза (ЛТИ) [2]. Хотя пациенты с латентной туберкулезной инфекцией не имеют клинических симптомов, у 5–10 % из них может развиться активный ТБ [3]. Одним из направлений «Стратегии по ликвидации туберкулеза», разработанной Всемир-

ной организацией здравоохранения, является внедрение в практику новых диагностических средств для выявления туберкулеза, диагностических методов и систем для ускоренного определения лекарственной устойчивости возбудителя туберкулеза, направленных на повышение качества диагностики туберкулеза [4].

Ввиду того, что диагностика туберкулеза может быть сложной из-за разнообразия клинических форм заболевания, необходимо разработать простые, надежные и экономичные биомаркеры для повышения качества диагностики заболевания [5].

В качестве одного из потенциальных маркеров для оценки тяжести заболевания и контроля эффективности противотуберкулезной терапии, можно рассматривать изменение способности нейтрофильных лейкоцитов к формированию внеклеточных ловушек [6]. В свою очередь нетоз – это процесс, когда нейтрофил, выбрасывая деконденсированную ДНК, реализует защитную стратегию, заключающуюся в захвате и уничтожении патогенна в формирующейся нейтрофильных внеклеточных ловушках (НВЛ) [7].

Поскольку многие вопросы в отношении исследования нетоза остаются дискуссионными, а сами НВЛ представляют собой сложные надмолекулярные нуклеопротеиновые структуры, вполне закономерным представляется отсутствие «золотого стандарта» для определения интенсивности нетоза у здоровых людей и у пациентов с различной патологией. Оценка выраженности происходящего *in vivo* нетоза может осуществляться путем выявления компонентов НВЛ, циркулирующих в крови и биологических жидкостях. К таким маркерам, например, традиционно относят цитруллинированный гистон H3 (CitH3), так как PAD4-индуцированная модификация гистонов инициирует деконденсацию ДНК, предшествуя формированию НВЛ. Другой распространенный подход заключается в непосредственной визуализации ловушек при помощи различных техник микроскопии, в сочетании оценкой способности нейтрофилов к формированию НВЛ. Каждый из подобных подходов имеет ряд ограничений и областей применения. Люминесцентно-микроскопический метод затруднен необходимостью получения нейтрофилов непосредственно в очаге воспаления. Для преодоления этого ограничения предлагаемая нами методика предполагает оценку способности к нетозу пула нейтрофилов периферической крови, обладающих измененной реактивностью, «про-нетотическим» фенотипом. Напротив, цитруллинированный гистон H3 в крови является продуктом нетоза, но точную локализацию произошедших событий по формированию НВЛ в случае этого маркера установить невозможно. Вероятно, что наиболее целесообразным представляется оценка комбинации этих маркеров. Кроме того, значимыми могут оказаться и другие, ассоциированные с нетозом маркеры. Например, пептидил-аргинин деиминаза 4 (PAD4) – фермент, обеспечивающий процесс цитруллинизации гистонов; Динамин-подобный белок-1 (DRP-1, синоним DNM1L), как возможный маркер митохондриального нетоза [8]. Отдельную роль может играть оценка

цитокинового профиля, в условиях которого происходит нетоз.

Цель исследования. Определить способность нейтрофилов периферической крови к формированию внеклеточных ловушек *ex vivo*, содержание цитруллинированного гистона H3, пептидил-аргинин деиминазы 4, динамин-подобного белка-1, интерлейкинов 1 и 8 в крови после 6-месячного курса превентивной химиотерапии латентной туберкулезной инфекции у детей.

Материалы и методы.

Исследование, выполняемое в рамках научного проекта №23–25–10043 (грант РФФИ) 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)» единогласно одобрено членами Этического комитета ФГБОУ ВО Омский государственный медицинский университет (выписка из протокола №5 от 28.04.2023).

Пациенты

В группу «Контроль» вошли 30 здоровых детей, наблюдавшихся на педиатрических участках поликлинических учреждений первичного звена здравоохранения, у которых по результатам ежегодной туберкулинодиагностики отмечена отрицательная реакция на туберкулезный аллерген (АТ) (туберкулин).

В Группу «АТР+», вошли 27 детей с латентной туберкулезной инфекцией (ЛТИ) при положительной пробе с аллергеном туберкулезным рекомбинантным (АТР). В группе «АТР+» все исследования проводились в двух исследовательских точках: точка 1 – на момент первичного выявления ЛТИ, точка 2 – через 6 мес. после начала превентивной химиотерапии.

Критерии соответствия.

Критерии включения и исключения группы «Контроль»

Критерии включения в группу «Контроль»: возраст от 4-х до 7-и лет; отрицательная проба с АТ (проба Манту с 2 ТЕ) при проведении ежегодной плановой иммунодиагностики; отсутствие контакта с больными туберкулезом в семье; информированное согласие родителей (или законных представителей) ребенка на включение в исследование.

Критерии исключения: наличие ВИЧ-инфекции у ребенка; отсутствие информированного согласия родителей (законных представителей) на участие в исследовании.

Критерии включения и исключения группы «АТР+»

Критерии включения: возраст от 4-х до 14-ти лет; впервые выявленные положительные кожные иммунологические тесты: проба с АТ (Манту с 2 ТЕ) и проба с АТР (диаскинтест), по поводу которых ребенок направлен в противотуберкулезное учреждение; отсутствие активного туберкулеза и остаточных не активных посттуберкулезных изменений по результатам мультиспиральной компьютерной томографии органов грудной клетки; взяты на учет и последующее наблюдение в противотуберкулезном

учреждении по VI–A группе диспансерного учёта; назначение превентивной химиотерапии латентной туберкулезной инфекции; информированное согласие родителей (или законных представителей) ребенка на включение в исследование.

Критерии исключения: наличие ВИЧ–инфекции у ребенка; отсутствие информированного согласия родителей (законных представителей) на участие в исследовании.

Исследование способности нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек.

Способность нейтрофилов к формированию внеклеточной ловушки исследовали *ex vivo* после выделения нейтрофилов из периферической крови на двойном градиенте плотности фиколла–верографина по запатентованной методике [9]. Для этого нейтрофилы инкубировали с неспецифическим антигенным стимулятором в течение 30 мин при температуре 37°C. В качестве антигенного стимулятора нетоза использовали смесь *Lactobacillus reutri*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* и *Bifidumbacterium longum* в составе коммерческого пробиотика. Стимулированные нейтрофилы использовали для приготовления препарата «раздавленная капля» предварительно окрашивая клетки и НВЛ, формирующиеся в процессе стимуляции, двумя красителями – пропидия йодидом и моноклональными антителами CD15/FITC (ДАКО, США).

Посредством люминесцентной микроскопии подсчитывали в приготовленном *ex tempore* препарате: 1) интактные нейтрофилы, 2) активированные нейтрофилы, 3) гиперактивированные нейтрофилы, 3) клетки раннего нетоза, 4) облаковидные НВЛ, 5) нитевидные НВЛ, 6) общую долю облаковидных и нитевидных НВЛ в препарате (рис. 1).

Исследования, выполненные методом иммуноферментного анализа.

Цитруллинированный гистон H3 (citH3) определяли в образцах сыворотки крови, используя набор реактивов для иммуноферментного анализа «Citrullinated Histone H3 (Clone 11D3)»; производитель – Cayman Chemical Company (США), пептидил–аргинин деиминазу 4 (PAD4) определяли в образцах сыворотки крови, используя набор реактивов для иммуноферментного анализа «Human PAD14 (Peptidyl Arginine Deiminase Type IV) ELISA Kit»; производитель Elabscience (Китай); Динамин–подобный белок–1 (DRP–1, синоним DNM1L) определяли в образцах сыворотки крови, используя набор реактивов для иммуноферментного анализа «E01D0450 Human Dynamin 1 Like Protein ELISA kit DNM1L»; производитель BlueGene (Китай); Интерлейкин–1 бета и интерлейкин–8 определяли в сыворотке крови наборами для иммуноферментного анализа «Интерлейкин–1 бета–ИФА–БЕСТ», «Интерлейкин–8–ИФА–БЕСТ»; производитель Вектор–Бест (Россия). Все этапы исследования выполнены, согласно сопроводительной документации к указанному наборам.

Статистические процедуры.

Для анализа нормальности распределения величин возраста в исследуемых группах использовали критерий Шапиро–Уилка, который показал отсутствие нормального распределения во всех группах ($p < 0,05$). В группе «Контроль» медиана (Me) и межквартильный интервал (Q1–Q3) возраста составила Me=6 (5; 7), а в группе «АТР+» – Me=8 (6; 13). Дошкольниками в группе «Контроль» было 39 (65%) детей, в группе «АТР+» 9 (34,%) ($\chi^2=6,79$; $p=0,009$); среднего школьного возраста – в группе «Контроль» 21 (35%) ребенок, в группе «АТР+» 7

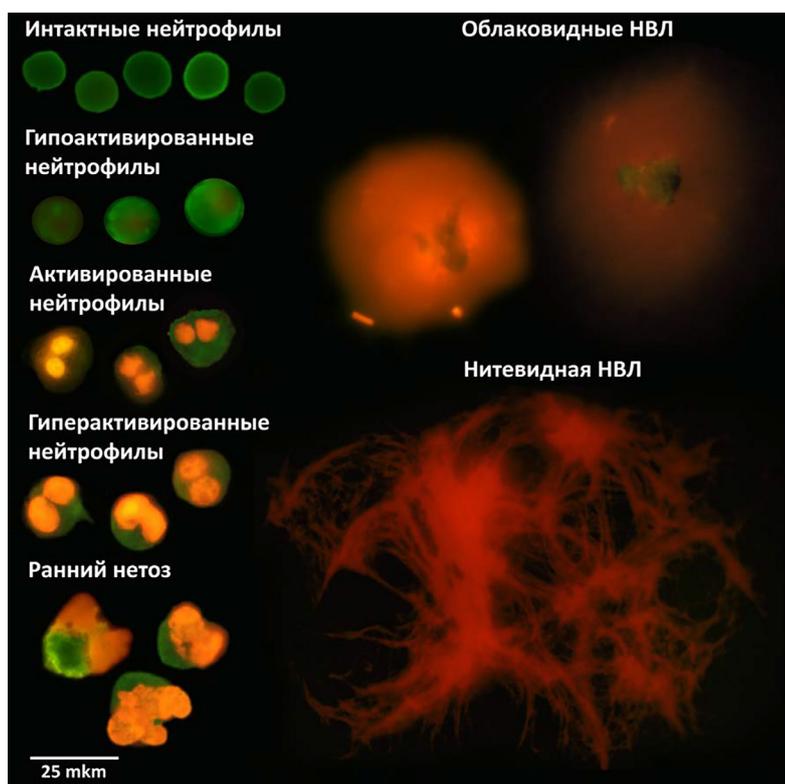


Рисунок 1. Примеры визуализируемых нейтрофильных внеклеточных ловушек и клеток разной степени активации в препарате изолированных нейтрофилов до стимуляции и после стимуляции пробиотиком. Люминесцентная микроскопия, $\times 1000$
Figure 1. Examples of visualized NETs and cells of different activation degrees in a preparation of isolated neutrophils before and after probiotic stimulation. Luminescence microscopy, $\times 1000$

(26,9%) ($\chi^2=0,54$; $p=0,463$) и 10 (38,5%) детей среднего школьного возраста только в группе «АТР+». Мальчики преобладали в группе «контроль» – 40 (66,7%) и составили меньшую часть в группе «АТР+» – 11 (42,3%) ($\chi^2=4,46$; $p=0,034$).

Исследуемые показатели во всех сравниваемых группах имели распределение, отличное от нормального, поэтому все данные обрабатывали непараметрическими методами. Результаты исследования представлены в виде медианы (Me) и межквартильного интервала (Q1–Q3). Уровень статистической значимости различий между группами «Контроль» и «АТР+» оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни, для сравнения двух зависимых выборок между точками 1 и 2 в группе «АТР+» использовали T-критерий Вилкоксона. Данные обрабатывали в программе Statistica 10. Статистически значимым считали различия при $p<0,05$.

Результаты и их обсуждение.

По результатам диаскинтеста группа «АТР+» на момент выявления ЛТИ до начала превентивной химиотерапии (1-я исследовательская точка) имела следующие характеристики: слабовыраженная проба наблюдалась у 2 (7,7%) детей, умеренно выраженная – у 9 (34,6%), выраженная (но не гиперергическая) – у 11 (42,3%) и гиперергическая – у 4 (15,4%). Через 6 мес. после начала превентивной химиотерапии (2-я исследовательская точка) у 1 (7,1%) ребенка реакция на внутрикожное введение диаскинтеста стала отрицательной, у 1 (7,1%) сомнительной, у 7 (50%) умеренно выраженной, у 4

(28,6%) выраженной и у 1 (7,1%) гиперергической. Лечение противотуберкулезными препаратами (изониазид, пиразинамид) получили 11 детей, 3 ребенка не лечились по причине отказа родителей. Принято 180 доз противотуберкулезных препаратов 7 детьми и 90 доз 4 детьми. Гепатотоксическая реакция в виде увеличения сывороточной активности трансаминаз регистрировалась у 2 детей, у одного ребенка возникла аллергическая реакция.

Способность нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек в группе «АТР+» в исследовательской точке 1 была статистически значимо выше в сравнении с показателями группы «Контроль» (табл. 1). В частности, нейтрофилы периферической крови детей с выявленной ЛТИ при положительной пробе с аллергеном туберкулезным рекомбинантным до проведения превентивной химиотерапии (1 исследовательская точка), после воздействия неспецифического антигенного стимулятора чаще формировали нитевидные НВЛ в сравнении с группой «Контроль» ($p=0,0419$). Медиана доли нитевидных НВЛ в группе «АТР+» (1 исследовательская точка) была на 68,8% выше медианы, наблюдаемой в группе «Контроль». Также в группе «АТР+» (1 исследовательская точка) наблюдалось статистически значимое снижение процентного отношения клеток раннего нетоза и активированных нейтрофилов в ex vivo препаратах-после инкубации с неспецифическим антигенным стимулятором и тенденция к снижению доли гиперактивированных нейтрофилов в сравнении с процентным отноше-

Таблица 1

Способность нейтрофилов периферической крови к формированию внеклеточных ловушек, определяемая после 30 мин инкубации с неспецифическим антигенным стимулятором, у здоровых детей (группа «Контроль») и у детей с латентной формой туберкулеза в процессе проведения превентивной химиотерапии в исследовательских точках 1 и 2 (группы АТР+ (точка 1) и АТР+ (точка 2), соответственно), Me (Q1; Q3)

Table 1

Peripheral blood neutrophils' ability to form NETs, detected after 30-min incubation with a nonspecific antigenic stimulant in healthy children (Control Group) and in children with latent tuberculosis infection during preventive chemotherapy at study points 1 and 2 (RTA+ (point 1) and RTA+ (point 2) groups, respectively), Me (Q1; Q3)

Объекты, обнаруживаемые в микропрепаратах после 30 мин инкубации с неспецифическим антигенным стимулятором	Исследуемые группы		
	Контроль	АТР+ (точка 1)	АТР+ (точка 2)
Интактные нейтрофилы, %	53,7 (48,3; 59,9)	54,8 (42,0; 64,2)	62,8 (43,0; 77,5)
Активированные нейтрофилы, %	11,9 (9,0; 14,8)	1,6 (0,5; 3,6) $p_1=0,0002$	5,5 (0,0; 11,5) $p_1=0,0287$
Гиперактивированные нейтрофилы, %	6,9 (4,5; 7,5)	3,1 (0,3; 7,2)	4,0 (0,5; 7,9)
Клетки раннего нетоза, %	6,6 (4,2; 9,8)	3,0 (1,6; 5,3) $p_1=0,0032$	6,2 (1,6; 14,5) $p_2=0,0499$
Облаковидные НВЛ, %	5,0 (3,7; 7,7)	3,8 (1,1; 9,8)	1,7 (0,0; 7,9)
Нитевидные НВЛ, %	16,0 (11,9; 19,0)	27,3 (13,3; 41,9) $p_1=0,0419$	10,0 (1,6; 22,0) $p_2=0,0357$
Общая доля облаковидных и нитевидных НВЛ, %	20,2 (18,0; 25,6)	32,0 (22,2; 48,6)	15,5 (6,6; 28,3) $p_2=0,0117$

Примечание. Уровень значимости различий выражен в абсолютных значениях p (p_1 – значимость различий по отношению к группе «Контроль», U-критерий Манна–Уитни; p_2 – значимость различий по отношению к группе «АТР+ (точка 1)», критерий Вилкоксона). НВЛ – нейтрофильные внеклеточные ловушки.

Note. The significance of the differences is expressed in the absolute p values (p_1 – significance of the differences as related to the Control Group, Mann–Whitney U-test; p_2 – significance of the differences in relation to the АТР+ (point 1) group, Wilcoxon test).

нием соответствующих клеток в препаратах группы «Контроль» (табл. 1). Наблюдалась тенденция к увеличению общей доли облаковидных и нитевидных НВЛ в препарате нейтрофилов группы «АТР+» (точка 1) после действия антигенного стимулятора в сравнении с группой «Контроль» – значение медианы в группе «Контроль» было на 58,4% ниже значения группы «АТР+» (точка 1) (табл. 1).

После проведения превентивной химиотерапии латентной туберкулёзной инфекции значения показателей способности нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек приближались к таковым у обследуемых из группы «Контроль» (табл. 1). Общая доля облаковидных и нитевидных НВЛ в группе «АТР+» (точка 2) была статистически значимо меньше ($p=0,0117$) доли, наблюдаемой в группе «АТР+» в первой исследовательской точке за счёт преимущественного и статистически значимого ($p=0,0357$) снижения доли нитевидных НВЛ, формируемых нейтрофилами детей группы «АТР+» (точка 2) после действия неспецифического антигенного стимулятора (табл. 1). Доля клеток раннего нетоза в группе «АТР+» (точка 2) была статистически значимо больше в сравнении процентным отношением в первой исследовательской точке группы «АТР+». Во второй исследовательской точке группы «АТР+» наблюдали тенденцию к увеличению процентного отношения активированных нейтрофилов в препарате после действия стимулятора по отношению к показателям первой исследовательской точки, однако доля активированных нейтрофилов по прежнему была статистически значимо ниже процентного отношения, рассчитанного в группе «Контроль» (табл. 1).

Среди других определяемых аналитов: ни содержание PAD4, ни содержание динамин-подобного белка-1 значимо не различалось между группами, несмотря на наличие тенденции к повышению уровня динамин-подобного белка-1 в группе АТР+ в первой исследовательской точке (табл. 2.).

Содержание цитруллинированного гистона H3 в сыворотке венозной крови в первой исследовательской точке группы «АТР+» составило $Me=5,60$ ($Q1=2,80$; $Q3=12,00$) и было статистически значимо выше в сравнении со значениями группы «Контроль» – $Me=1,41$ ($Q1=0,91$; $Q3=1,78$). В процессе

превентивной химиотерапии концентрация цитруллинированного гистона H3 снизилась – $Me=1,20$ ($Q1=0,90$; $Q3=1,50$), достигнув значений, не отличавшихся от наблюдавшихся в группе «Контроль» (рис.2).

Одним из эффективных путей снижения заболеваемости туберкулезом в мире считается превентивная химиотерапия (ПХТ) при латентной туберкулезной инфекции. Однако остается ряд вопросов, которые необходимо решать для повышения успешности самой ПХТ, что, в конечном итоге, может повысить эффективность предупреждения активной формы туберкулеза [10]. В частности, оценка эффективности ПХТ, в связи с возможным заражением лекарственно-устойчивыми штаммами *Mycobacterium tuberculosis* и/или вероятным развитием осложнений [11], так как для Западной Сибири актуальной проблемой является факт распространения *Micobacterium tuberculosis* линии Beijing, имеющих повышенную вирулентность и характеризующихся высокой частотой возникновения лекарственноустойчивых форм [12, 13].

Проведённое нами исследование показало, что в случае успешной ПХТ наблюдается нормализация концентрации CitH3 в сочетании со снижением способности нейтрофилов к формированию НВЛ, которые уже через 6 мес. после начала ПХТ не отличались от контрольных значений. Снижение выраженности проявлений нетоза в процессе ПХТ может быть результатом снижения микробной нагрузки на организм детей, что косвенно подтверждается некоторыми публикациями, в которых было показано, что нейтрофилы способны реагировать на *Micobacterium tuberculosis*, формируя НВЛ [14].

Кроме того, в эксперименте на морских свинках показано, что *Micobacterium tuberculosis* индуцирует выработку НВЛ in vivo [15]. Другие микобактерии, такие как *Micobacterium bovis BCG* и *Micobacterium smegmatis*, а также липосомы, полученные из *Micobacterium tuberculosis*, также являются индукторами НВЛ. Однако НВЛ не способны уничтожить *Micobacterium tuberculosis*, возможно, из-за сложной структуры его клеточной стенки и особенностей метаболизма, которыми обладает данный возбудитель [15].

Таблица 2

Содержание PAD4, динамин-подобного белка-1 в сыворотке крови у здоровых детей (группа «Контроль») и у детей с латентной формой туберкулёза в процессе проведения превентивной химиотерапии в исследовательских точках 1 и 2 (группы АТР+ (точка 1) и АТР+ (точка 2), соответственно), Me (Q1; Q3)

Table 2

Coconcentrations of serum PAD4 and dynamin-like protein-1 in healthy children (Control Group) and in children with latent tuberculosis infection during preventive chemotherapy at study points 1 and 2 (RTA+ (point 1) and RTA+ (point 2) groups, respectively), Me (Q1; Q3)

Аналит	Исследуемые группы		
	Контроль	АТР+ (точка 1)	АТР+ (точка 2)
Пептидил-аргинин деиминаза 4 (PAD4), нг/мл	0,71 (0,23; 1,42)	0,95 (0,20; 1,12)	0,83 (0,14; 1,31)
Динамин-подобный белок-1 (DRP-1, синоним DNM1L), нг/мл	3,1 (2,5; 3,8)	5,2 (2,9; 4,2)	2,9 (2,2; 3,7)

Примечание. Статистически значимых различий между группами не обнаружено, во всех случаях $p>0,05$. АТР – аллерген туберкулёзный рекомбинантный.

Note. There are no statistically significant differences between the groups, in all cases $p>0.05$. Abbreviation. RTA – recombinant tuberculosis allergen.

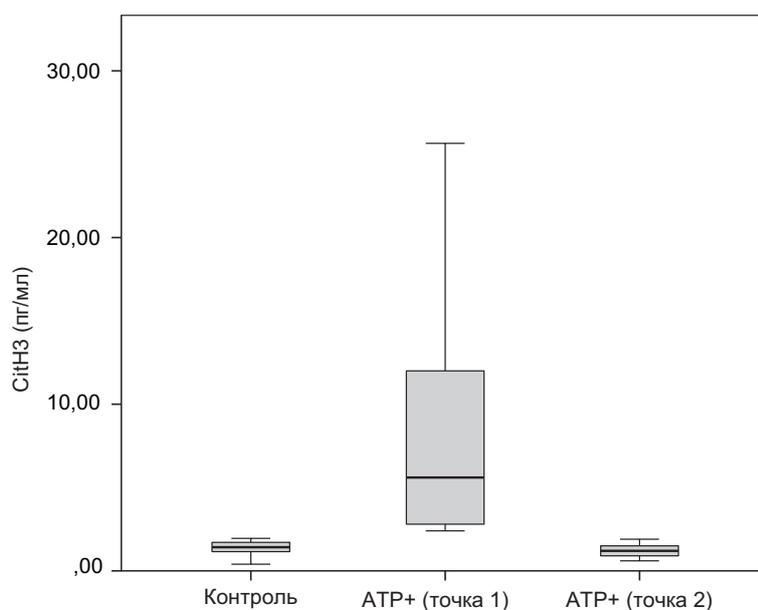


Рисунок 2. Уровни цитруллинированного гистона Н3 (CitH3) в сыворотке крови у здоровых детей (группа «Контроль») и у детей с латентной формой туберкулёза в процессе проведения превентивной химиотерапии в исследовательских точках 1 и 2 (группы АТР+ (точка 1) и АТР+ (точка 2), соответственно). Статистически значимые различия ($p=0,0002$, U–критерий Манна–Уитни) между группами «Контроль» и «АТР+ (точка 1)»; статистически значимые различия ($p=0,0077$, критерий Вилкоксона) между группами «АТР+ (точка 1)» и «АТР+ (точка 2)».

Примечание: АТР – аллерген туберкулёзный рекомбинантный.

Figure 2. Serum citrullinated histone H3 (CitH3) concentrations in healthy children (Control Group) and in children with latent tuberculosis infection during preventive chemotherapy at study points 1 and 2 (RTA+ (point 1) and RTA+ (point 2) groups, respectively). There is a significant difference ($p=0.0002$, Mann–Whitney U–test) between the Control and RTA+ (point 1) groups and a significant difference ($p=0.0077$, Wilcoxon test) between the RTA+ (point 1) and RTA+ (point 2) groups.

Abbreviation: RTA – recombinant tuberculosis allergen.

Концентрация провоспалительных цитокинов ИЛ–1 β и ИЛ–8 в сыворотке венозной крови во всех исследуемых группах достоверно значимо не отличалась (рис 3, 4). Однако в первой исследовательской точке в группе «АТР+» отмечалась тенденция к увеличению концентрации ИЛ–8 с последующей тенденцией к снижению на фоне проводимой превентивной химиотерапии (рис.3, 4).

По данным литературы цитокины ИЛ–1 β и ИЛ–8 являются одними из ключевых маркеров иммунного ответа на *Micobacterium tuberculosis* [16]. Главным источником ИЛ–1 β при воспалении, индуцируемым *Micobacterium tuberculosis*, являются макрофаги и дендритные клетки, которые посредством секреции этого цитокина рекрутируют другие клетки иммунной системы в очаг воспаления [17]. Низкие концентрации ИЛ–1 β в группе «АТР+» могут объясняться слабой выраженностью воспалительного процесса при ЛТИ в отличие от активных форм туберкулеза. Тенденция к увеличению концентрации ИЛ–8 в первой исследовательской точке в группе «АТР+» и тенденция к снижению во второй исследовательской точке соотносится с результатами исследования концентрации цитруллинированного гистона Н3 и изменением способности нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек, так как ИЛ–8, являясь мощным хемокином, способен направить в воспалительный очаг нейтрофилы, которые, реализуют в очаге воспаления свои защитные функции, в том числе и нетоз. Проводимая превентивная химиоте-

рапия способствовала снижению пронетотического потенциала нейтрофилов, что можно объяснить, в том числе, тенденцией к снижению концентрации хемокина ИЛ–8 в крови. Вероятно, что усиление готовности нейтрофила к нетозу способствуют несколько цитокинов, а не только ИЛ–8. Но для окончательного ответа на вопрос, какие цитокины изменяют реактивность нейтрофила при ЛТИ АТР+, необходимы дополнительные исследования. Тем не менее, обращает на себя внимание тот факт, что в то время когда изменения в концентрации цитокинов носили эфемерный характер, способность нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек значимо изменялась, равно как и происходило статистически значимое изменение концентрации маркера состоявшегося нетоза – цитруллинированного гистона Н3. Таким образом, исследование показателей, характеризующих нетоз, является более чутким маркером ЛТИ, в отличие от изменения концентрации цитокинов ИЛ–1 β и ИЛ–8 в крови.

Снижение выраженности проявлений нетоза после превентивной химиотерапии может объясняться не только непосредственным подавлением активности возбудителя, но и эффектами самих antimicrobial препаратов, которые непосредственно могут повлиять на нейтрофилы, снижая их способность к формированию НВЛ. Данное предположение основывается на результатах исследований, в которых показано, что некоторые антибиотики, включая бета–лактамы и цефалоспорины, играют

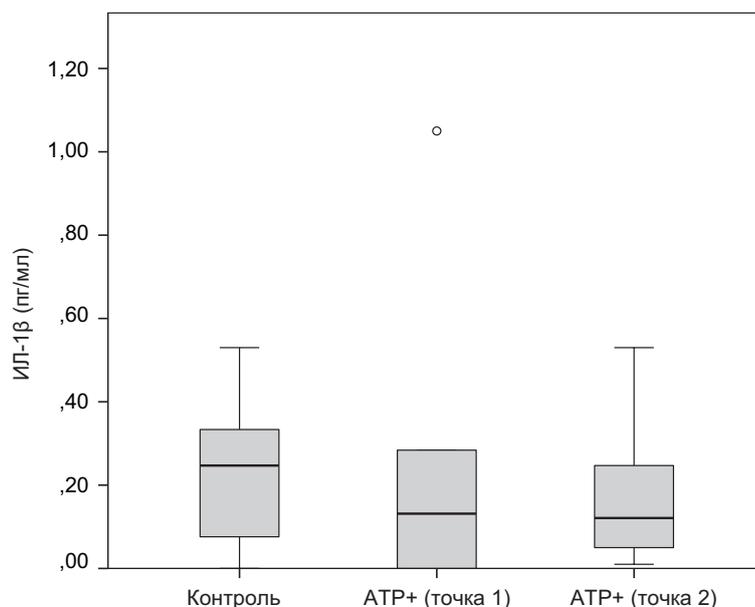


Рисунок 3. Концентрация ИЛ-1 β в сыворотке крови у здоровых детей (группа «Контроль») и у детей с латентной формой туберкулёза в процессе проведения превентивной химиотерапии в исследовательских точках 1 и 2 (группы АТР+ (точка 1) и АТР+ (точка 2), соответственно).

Статистически значимых различий между группами не обнаружено, во всех случаях $p > 0,05$

Примечание: АТР – аллерген туберкулёзный рекомбинантный.

Figure 3. Serum IL-1 β concentrations in healthy children (Control Group) and in children with latent tuberculosis infection during preventive chemotherapy at study points 1 and 2 (RTA+ (point 1) and RTA+ (point 2) groups, respectively),

Me (Q1; Q3). There are no statistically significant differences between the groups, in all cases $p > 0.05$

Abbreviation. RTA – recombinant tuberculosis allergen.

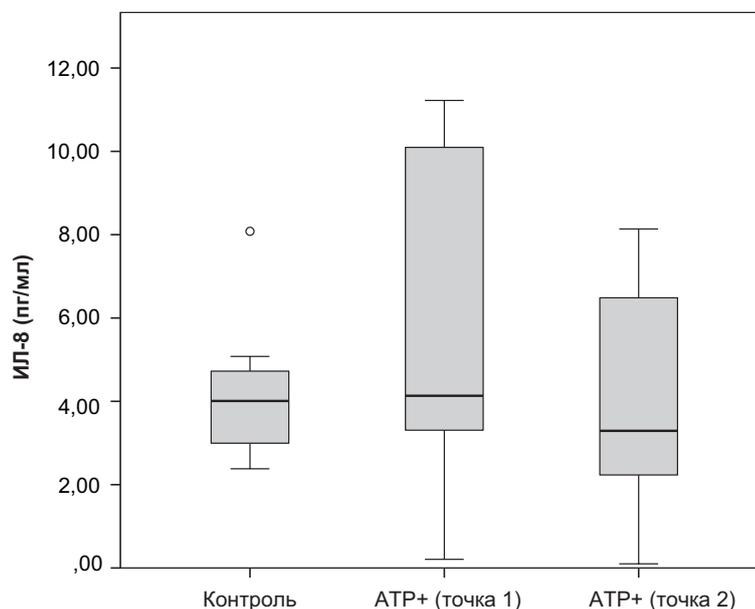


Рисунок 4. Концентрация ИЛ-8 в сыворотке крови у здоровых детей (группа «Контроль») и у детей с латентной формой туберкулёза в процессе проведения превентивной химиотерапии в исследовательских точках 1 и 2 (группы АТР+ (точка 1) и АТР+ (точка 2), соответственно).

Статистически значимых различий между группами не обнаружено, во всех случаях $p > 0,05$.

Примечание: АТР – аллерген туберкулёзный рекомбинантный.

Figure 4. Serum IL-8 concentrations in healthy children (Control Group) and in children with latent tuberculosis infection during preventive chemotherapy at study points 1 and 2 (RTA+ (point 1) and RTA+ (point 2) groups, respectively),

Me (Q1; Q3). There are no statistically significant differences between the groups, in all cases $p > 0.05$

Abbreviation. RTA – recombinant tuberculosis allergen.

иммуномодулирующую роль, с одной стороны, снижая образование НВЛ, а, с другой стороны – ускоряя деградацию уже сформировавшихся НВЛ, что, в конечном итоге, приводит к минимизации повреждения органов [18, 19, 20, 21]. Однако для полного понимания клинических последствий взаимодействия НВЛ и противотуберкулезных препаратов и лежащих в его основе механизмов необходимы дальнейшие исследования.

Таким образом, среди исследованных маркеров нетоза наибольшую информативность показал цитруллинированный гистон H3. Изменение способности нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек также можно рассматривать как один из признаков ЛТИ. Снижение концентрации citH3 в крови в процессе превентивной химиотерапии представляется вполне закономерным в связи с наблюдаемым у нейтрофилов снижением способности к нетозу [22]. В то же время отсутствие пропорциональных изменений концентрации PAD4 в сыворотке крови объяснимо тем, что образование цитруллинированного гистона H3, сопровождающее процесс нетоза, вероятнее всего зависит от активности фермента на ранних стадиях включения этого механизма и его аллостерической регуляции [23] и мало взаимосвязано с количеством высвободившегося из нейтрофилов фермента. Отсутствие различий между группами в содержании динамин-подобного белка-1 может объясняться малым вкладом митохондриального нетоза в защитную стратегию нейтрофила при ЛТИ. Тем более, что митохондриальная ДНК в отличие от ядерной не содержит гистонов, избыточная цитруллинизация которых была определена у пациентов с ЛТИ АТР+ в первой исследовательской точке. Возможно, что повышение уровня динамин-подобного белка-1 в крови следует ожидать при формировании первичного туберкулезного комплекса, поскольку содержание данного белка в макрофагах повышается при фагоцитировании *Micobacterium tuberculosis* [24]. Тенденцию к увеличению концентрации хемокина ИЛ-8 в крови можно рассматривать как один из факторов, способных увеличить способность нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек.

Выводы. В процессе превентивной химиотерапии латентной туберкулезной инфекции, на фоне достижения положительных клинических результатов наблюдалась нормализация способности нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек – снижалась доля нитевидных НВЛ в препарате изолированных нейтрофилов после действия неспецифического антигенного стимулятора, наблюдалась нормализация процентных отношений активированных и гиперактивированных нейтрофилов и клеток раннего нетоза. Отмеченное снижение содержания CitH3 в крови после ПХТ подтверждало ослабление нетоза. Следовательно, нормализация способности нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек *ex vivo* и снижение CitH3 в крови можно рассматривать в качестве потенциальных маркеров достижения положительного результата превентивной химиотерапии при латентной туберкулезной инфекции.

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

Декларация о финансовых и других взаимоотношениях. Все авторы принимали участие в разработке концепции и дизайна исследования и в написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23–25–10043, <https://rscf.ru/project/23–25–10043/>

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Dheda K, Barry CE 3rd, Maartens G. Tuberculosis. *Lancet*. 2016; 387 (10024): 1211–26. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)00151-8
2. Cohen A, Mathiasen VD, Schön T, Wejse C. The global prevalence of latent tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J*. 2019; 54 (3): 1900655. DOI: 10.1183/13993003.00655-2019. PMID: 31221810.
3. Sterling TR, Njie G, Zenner D, et al. Guidelines for the Treatment of Latent Tuberculosis Infection: Recommendations from the National Tuberculosis Controllers Association and CDC, 2020. *MMWR Recomm Rep*. 2020; 69 (1): 1–11. DOI: 10.15585/mmwr.rr6901a1
4. WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 1: Prevention – Tuberculosis preventive treatment, second edition [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2024. Режим доступа [URL]: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240097773>
5. Kontsevaya I, Cabibbe AM, Cirillo DM, et al. Update on the diagnosis of tuberculosis. *Clin Microbiol Infect*. 2024; 30 (9): 1115–1122. DOI: 10.1016/j.cmi.2023.07.014
6. Мордык А.В., Золотов А.Н., Новиков Д.Г., [и др.]. Нетозобразующая способность нейтрофилов у детей с латентной туберкулезной инфекцией при положительной пробе с аллергеном туберкулезным рекомбинантным // Вопросы практической педиатрии. – 2023. – Т. 18, № 5. – С.7–12. [Mordyk AV, Zolotov AN, Novikov DG, et al. Netozobrazuyushchaya sposobnost' nejtrofilov u detej s latentnoj tuberkuleznoj infekciej pri polozhitel'noj probe s allergenom tuberkuleznym rekombinantnym [NETosis-forming ability of neutrophils in children with latent tuberculosis infection with the positive test with a tuberculosis recombinant allergen]. *Voprosy prakticheskoy pediatrii [Clinical Practice in Pediatrics]*. 2023; 18 (5): 7–12. (In Russ.)). DOI: 10.20953/1817-7646-2023-5-7-12
7. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004; 303 (5663): 1532–1535. DOI: 10.1126/science.1092385
8. Воробьева Н.В., Кулаков В.В. Роль белка DRP1, ответственного за фрагментацию митохондрий, в окислительном взрыве и нетозе нейтрофилов человека // Российский иммунологический журнал. – 2019. – Т. 22, №2–2. – С.733–735. [Vorobjeva NV, Kulakov VV. Rol' belka DRP1, otvetstvennogo za fragmentaciju mitohondrij, v okislitel'nom vzryve i netoze nejtrofilov cheloveka [The role of DRP1 protein, responsible for mitochondrial fragmentation, in the oxidative burst and netosis of human neutrophils]. *Rossijskij immunologicheskij zhurnal [Russian Journal of Immunology]*. 2019; 22 (2–2): 733–735. (In Russ.)). DOI: 10.31857/S102872210006720-7
9. 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: опубл. 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. [Novikov DG, Zolotov AN, Kirichenko NA, Mordyk AV. Patent No 2768152 C1 Russian Federation, IPC G01N 33/569, G01N 33/533, G01N 33/577: Sposob obnaruzheniya nejtrofil'nykh vnekletochnykh lovushek v supravital'no okrashennom preparate krovi № 2021129097 [Patent No 2768152 C1 Russian Federation, IPC G01N 33/569, G01N 33/533, G01N 33/577: Method for detection of neutrophil extracellular traps in supravital stained blood preparation № 2021129097]. Omsk: Omskii gosudarstvennii medicinskii universitet [Omsk: Omsk State Medical University]. 2022; 20 p. (In Russ.)].
10. Глушаков И.А., Лозовская М.Э., Гуткин М.Г., [и др.]. Латентная туберкулезная инфекция у детей и подростков: вопросы превентивного лечения // Children's Medicine of the North–West. – 2024. – Т. 12, № 2. – С.187–194. [Glushakov IA, Lozovskaya ME, Gutkin MG, et al. Latentnaya tuberkuleznaya infekciya u detej i podrostkov: voprosy preventivnogo lecheniya [Latent tuberculosis infection in children and adolescents: preventive treatment issues]. Children's Medicine of the North–West [Children's Medicine of the North–West]. 2024; 12 (2): 187–194. (In Russ.)]. DOI: 10.56871/CmN–W.2024.88.83.018
 11. Аксенова В.А., Клевно Н.И., Казаков А.В., [и др.]. Превентивная химиотерапия у детей из очагов туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя // Туберкулез и болезни легких. – 2019. – Т. 97, № 6. – С. 36–43. [Aksenova VA, Klevno NI, Kazakov AV, et al. Preventivnaya himioterapiya u detej iz ochagov tuberkuleza s mnozhestvennoj lekarstvennoj ustojchivost'yu vozбудителя [Preventive chemotherapy in children exposed to multiple drug resistant tuberculosis]. Tuberkulez i bolezni legkih [Tuberculosis and Lung Diseases]. 2019; 97 (6): 36–43. (In Russ.)]. DOI: 10.21292/2075–1230–2019–97–6–36–43
 12. Mokrousov I, Vyazovaya A, Sinkov V, et al. Practical approach to detection and surveillance of emerging highly resistant Mycobacterium tuberculosis Beijing 1071–32–cluster. *Sci Rep.* 2021; 11 (1): 21392. DOI: 10.1038/s41598–021–00890–7
 13. Vinogradova T, Dogonadze M, Zabolotnykh N, et al. Extremely lethal and hypervirulent Mycobacterium tuberculosis strain cluster emerging in Far East, Russia. *Emerg Microbes Infect.* 2021; 10 (1): 1691–1701. DOI: 10.1080/22221751.2021.1967704
 14. Ramos–Kichik V, Mondragón–Flores R, Mondragón–Castelán M, et al. Neutrophil extracellular traps are induced by Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb).* 2009; 89 (1): 29–37. DOI: 10.1016/j.tube.2008.09.009
 15. Filio–Rodríguez G, Estrada–García I, Arce–Paredes P, et al. In vivo induction of neutrophil extracellular traps by Mycobacterium tuberculosis in a guinea pig model. *Innate Immun.* 2017; 23 (7): 625–637. DOI: 10.1177/1753425917732406
 16. Hilda JN, Das S, Tripathy SP, Hanna LE. Role of neutrophils in tuberculosis: A bird's eye view. *Innate Immun.* 2020; 26 (4): 240–247. DOI: 10.1177/1753425919881176
 17. Jung BG, Vankayalapati R, Samten B. Mycobacterium tuberculosis stimulates IL–1 β production by macrophages in an ESAT–6 dependent manner with the involvement of serum amyloid A3. *Mol Immunol.* 2021; 135: 285–293. DOI: 10.1016/j.molimm.2021.04.022
 18. Bystrzycka W, Moskalik A, Sieczkowska S, et al. The effect of clindamycin and amoxicillin on neutrophil extracellular trap (NET) release. *Cent Eur J Immunol.* 2016; 41 (1): 1–5. DOI: 10.5114/ceji.2016.58811
 19. Moonen CG, Buurma KG, Faruque MR, et al. Periodontal therapy increases neutrophil extracellular trap degradation. *Innate Immun.* 2020; 26 (5): 331–340. DOI: 10.1177/1753425919889392
 20. Xie T, Duan Z, Sun S, et al. β –Lactams modulate neutrophil extracellular traps formation mediated by mTOR signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021; 534: 408–414. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.11.067
 21. Duan Z, Xie T, Chu C, et al. De–escalation antibiotic therapy alleviates organ injury through modulation of NETs formation during sepsis. *Cell Death Discov.* 2021; 7 (1): 345. DOI: 10.1038/s41420–021–00745–0
 22. Li M, Lin C, Leso A, Nefedova Y. Quantification of Citrullinated Histone H3 Bound DNA for Detection of Neutrophil Extracellular Traps. *Cancers (Basel).* 2020; 12 (11): 3424. DOI: 10.3390/cancers12113424
 23. Liu X, Arfman T, Wichapong K, et al. PAD4 takes charge during neutrophil activation: Impact of PAD4 mediated NET formation on immune–mediated disease. *J Thromb Haemost.* 2021; 19 (7): 1607–1617. DOI:10.1111/jth.15313
 24. Lee J, Choi JA, Cho SN, et al. Mitofusin 2–Deficiency Suppresses Mycobacterium tuberculosis Survival in Macrophages. *Cells.* 2019; 8 (11): 1355. DOI:10.3390/cells8111355