

ОПЫТ РАЗРАБОТКИ И ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА ИССЛЕДОВАНИЯ СПОСОБНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ К ФОРМИРОВАНИЮ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК

Новиков Д.Г.¹, Золотов А.Н.¹, Савочкина А.Ю.², Индутный А.В.¹,
Корпачева О.В.¹, Кириченко Н.А.¹

¹ ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Омск, Россия

² ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения
РФ, г. Челябинск, Россия

Резюме. Феномен образования нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ), или нетоз, играет ключевую роль в патогенезе инфекционных и воспалительных заболеваний. Однако отсутствие стандартизованных методов оценки НВЛ затрудняет корректную интерпретацию результатов. Цель исследования – разработать применимую на практике методику исследования способности нейтрофилов к формированию НВЛ, позволяющую корректно идентифицировать сопряженные с нетозом феномены. Нейтрофилы выделяли из периферической крови 15 здоровых доноров методом градиентного центрифугирования (фиколл-верографин, градиент плотности 1,077-1,105 г/мл). Для стимуляции нетоза использовали смесь бактерий (*Lactobacillus reuteri*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *Bifidobacterium longum*). Для визуализации НВЛ и других люминесцентно-позитивных объектов использовали интеркалирующий краситель пропидия йодид и антитела моноклональные мышиные к человеческим CD15/FITC. Люминесцентную микроскопию проводили при длине волн возбуждения 450-480 нм, эмиссии – от 515 нм. В препарате регистрировали интактные нейтрофилы (объекты ярко-зеленого цвета, без прокрашенного ядра), активированные нейтрофилы (ярко-зеленые с красно-оранжевым, окрашенным пропидия йодидом ядром), клетки раннего нетоза (ярко-зеленые клетки с выходом ядерного материала в одной или более локации за пределы клеточной мембрany), НВЛ: облаковидные (в виде «облака», окружающего нейтрофил или его фрагменты со всех сторон и более чем 1,5 раза больше его размера) и нитевидные (в виде нитей в 2 и более раза больше размера нейтрофила). Определяли долю каждого из типов наблюдаемых объектов относительно всех люминесцентно-позитивных объектов. В ходе оптимизации методики определены ключевые параметры: температура инкубации лейкоцитов со стимулятором (37 °C), его концентрация ($2,5 \times 10^9$ бактерий/мл), время стимуляции (30 мин). Оценка воспроизводимости метода показала приемлемый межсерийный коэффициент вариации: 13,8% для нитевидных и 15,2% для облаковидных НВЛ. Метод исследования

Адрес для переписки:

Новиков Дмитрий Георгиевич
ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения РФ
644099, Россия, г. Омск, ул. Ленина, 12.
Тел.: 8 (906) 991-80-88.
E-mail: novikov.dm.omsk@gmail.com

Address for correspondence:

Dmitriy G. Novikov
Omsk State Medical University
12 Lenin St
Omsk
644099, Russian Federation
Phone: +7 (906) 991-80-88.
E-mail: novikov.dm.omsk@gmail.com

Образец цитирования:

Д.Г. Новиков, А.Н. Золотов, А.Ю. Савочкина,
А.В. Индутный, О.В. Корпачева, Н.А. Кириченко
«Опыт разработки и применения метода исследования
способности нейтрофилов к формированию
внеклеточных ловушек» // Медицинская иммунология,
2025. Т. 27, № 6. С. 1435-1443.
doi: 10.15789/1563-0625-EID-3200

© Новиков Д.Г. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

D.G. Novikov, A.N. Zolotov, A.Yu. Savochkina, A.V. Indutny, O.V. Korpacheva, N.A. Kirichenko “Experience in development and application of a technique for studying the ability of neutrophils to form extracellular traps”, Medical Immunology (Russia)/Meditinskaya Immunologiya, 2025, Vol. 27, no. 6, pp. 1435-1443.
doi: 10.15789/1563-0625-EID-3200

© Novikov D.G. et al., 2025
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-EID-3200

был применен в различных группах пациентов, имеющих определенную инфекционную (туберкулез легких) и неинфекционную патологию (язвенный колит, аневризмальные костные кисты). Результаты оценки способности нейтрофилов к образованию НВЛ у представителей обследуемых когорт позволяют сделать вывод о достаточном уровне чувствительности и манифестности регистрируемых с помощью данной методики показателей.

Ключевые слова: нейтрофилы, нейтрофильные внеклеточные ловушки, нетоз, метод исследования, способность нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек, люминесцентная микроскопия

EXPERIENCE IN DEVELOPMENT AND APPLICATION OF A TECHNIQUE FOR STUDYING THE ABILITY OF NEUTROPHILS TO FORM EXTRACELLULAR TRAPS

Novikov D.G.^a, Zolotov A.N.^a, Savochkina A.Yu.^b, Indutny A.V.^a,
Korpacheva O.V.^a, Kirichenko N.A.^a

^a Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation

^b South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. The phenomenon of neutrophil extracellular trap (NETs) formation, or netosis, plays a key role in pathogenesis of infectious and inflammatory diseases. However, the lack of standardized methods for assessing NETs makes it difficult to correctly interpret the results. The aim of our study was to develop a feasible methodology to investigate the ability of neutrophils to form NETs, which would allow precise identification of netosis-associated phenomena. Neutrophils were isolated from peripheral blood of 15 healthy donors by gradient centrifugation (Ficoll-Verographin, density gradient 1.077–1.105 g/mL). A mixture of bacteria (*Lactobacillus reuteri*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *Bifidobacterium longum*) was used to stimulate netosis. Propidium iodide (PI), a DNA- intercalating dye, and murine monoclonal antibodies to human CD15/FITC were used to visualize NETs and other fluorescent objects. Luminescence microscopy was performed at excitation wavelengths of 450–480 nm and emission wavelengths of 515 nm. We have registered the following morphological variants: (1) intact neutrophils (bright green, without nuclear staining); (2) activated neutrophils (bright green with a red-orange, PI-stained nucleus); (3) early netosis cells (bright green cells with nuclear material released to one or more sites at cell membrane); (4) NETs: (a) cloud-shaped objects surrounding the neutrophil or its fragments from all sides, being and more than 1.5 times its size, and (b) filamentous forms seen as filament structures exceeding the neutrophil size>2-fold or more. The proportion of each type of observed objects relative to all fluorescent-positive objects was determined. Upon optimization of this method, the key parameters were determined: temperature of cell incubation with the stimulant (37 °C); its concentration (2.5×10⁹ bacteria/mL), stimulation time (30 min). Testing the reproducibility of this technique showed an acceptable inter-series coefficient of variation (CV): 13.8% for filamentous and 15.2% for cloud-shaped NETs. The proposed method was applied in different groups of patients with certain infectious (pulmonary tuberculosis) and non-infectious pathology (ulcerative colitis, aneurysmal bone cysts). Testing the NET-producing ability of neutrophils in the subjects from these cohorts allows us to conclude that the levels of sensitivity and manifestations for these indexes registered with this technique are quite satisfactory.

Keywords: neutrophils, neutrophil extracellular traps, netosis, research method, trap-forming ability, luminescence microscopy

Исследование выполнено с привлечением средств государственного задания Минздрава России на выполнение НИР «Технологии пациентоориентированного ведения больных различных возрастных групп детей и взрослых с латентной туберкулезной инфекцией, лекарственно чувствительным и лекарственно устойчивым туберкулезом с различным индексом коморбидно-

сти на основе углубленной оценки функциональных характеристик нейтрофильных лейкоцитов и подбора адьювантов химиотерапии» (№ ГР 124021500060-1 от 15.02.2024).

Введение

Открытие процесса формирования нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) – нето-

за как механизма неспецифической иммунной защиты произошло сравнительно недавно [9]. Вслед за этим появилось понимание его значения, как важного звена иммунопатологических процессов [7]. Несомненно, что данный феномен привлек внимание исследователей, которыми было разработано множество способов обнаружения как самих НВЛ, так и биомаркеров, сопряженных с нетозом [10, 14, 15]. Маркерный подход заключается в определении компонентов НВЛ, таких как цитруллинированный гистон H3 или нейтрофильная эластаза, циркулирующих в крови или присутствующих других биологических средах [15]. Однако ни один из этих маркеров не является специфичным для нетоза и появление их в кровотоке может быть сопряжено с иными клеточными процессами, отличными от нетоза [11, 15]. Обнаружение НВЛ в месте их формирования (очаге повреждения), как правило, затруднено, но в случае системного воспалительного процесса НВЛ могут быть обнаружены и в крови [15]. В экспериментальных работах НВЛ можно получить, стимулируя культуру нейтрофильных лейкоцитов, однако, в зависимости от вида стимуляторов могут активироваться различные механизмы нетоза [7]. Кроме того, использование разнообразных комбинаций флуоресцентных красителей [15], а в отдельных методических подходах и световой микроскопии для определения компонентов НВЛ [1], отражает отсутствие «золотого стандарта» их определения и затрудняет дифференциацию нетоза от других видов клеточной смерти. Таким образом, перед исследователем нетоза нередко встает задача той или иной адаптации отдельных методик для обеспечения возможности наиболее достоверной идентификации событий состоявшегося нетоза при исследовании конкретного патологического процесса.

Цель настоящего исследования – разработать применимую на практике методику исследования способности нейтрофилов к формированию НВЛ, позволяющую корректно идентифицировать сопряженные с нетозом феномены.

Материалы и методы

Для исследования использовали образцы периферической венозной крови объемом 6 мл, собранные в вакуумную пробирку с наполнителем лития гепарином (Севегум, КНР). Все образцы крови были получены от 15 здоровых волонтеров (7 мужчин и 8 женщин) – сотрудников ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России в возрасте от 20 до 45 лет, в анамнезе не имеющих хронических аутоиммунных и инфекционных заболеваний, не перенесших острых воспалительных заболеваний в течение 2 недель до обследования, для

женщин – вне менструального цикла и не принимающих гормональные контрацептивные препараты. Образцы крови и данные пациентов были получены во время проведения профилактического медицинского осмотра сотрудников организации.

Нейтрофилы выделяли из образцов крови согласно стандартному протоколу на растворе фильтра-верографина (ООО НПП «ПанЭко», Россия) – градиент плотности 1,077-1,105 г/мл [12]. Собранные нейтрофилы дважды отмывали физиологическим раствором натрия хлорида (ООО НПП «ПанЭко», Россия). Затем, после подсчета в камере Горяева, концентрацию нейтрофилов доводили при помощи 1%-ного раствора альбумина (ООО НПП «ПанЭко», Россия) в растворе Хенкса (ООО НПП «ПанЭко», Россия) до 5×10^6 клеток на 1 мл. Визуальная микроскопия выделенных клеток показала, что нейтрофилы составляли более 97% от общего числа клеток. Жизнеспособность клеток, окрашенных трипановым синим (ООО «БиоЛоТ», Россия), составляла более 95%.

На выделенные нейтрофилы воздействовали неспецифическим антигенным стимулятором различной концентрации (смесь бактерий *Lactobacillus (L.) reuteri*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* и *Bifidobacterium longum* в составе коммерческого пробиотика Reuteri, Nature's Way, США), при различных температурных режимах. Исследовали влияние времени инкубации с антигенным стимулятором на интенсивность формирования нейтрофилами внеклеточных ловушек.

С помощью люминесцентной микроскопии (возбуждение 450-480 нм, эмиссия от 515 нм) идентифицировали люминесцентно-позитивные клетки и НВЛ. Для визуализации этих объектов использовали краситель пропидия йодид (Bio-Rad, США) и антитела моноклональные мышиные к человеческим CD15/FITC, клон C3D-1 (Dako, США). Интактные нейтрофилы визуализировались как объекты ярко-зеленого цвета (люминесценция связанных антител к CD15-FITC), без прокрашенного ядра; активированные нейтрофилы были ярко-зеленые с красно-оранжевым, окрашенным пропидия йодидом ядром; ярко-зеленые клетки с выходом ядерного материала в одной или более локации за пределы клеточной мембранные расценивались как клетки раннего нетоза. НВЛ окрашивались пропидия йодидом в красно-оранжевый цвет, иногда содержали фрагменты клеточной мембранны ярко-зеленого цвета. НВЛ подразделялись на нитевидные НВЛ – в виде нитей в 2 и более раза большие размера нейтрофила и облаковидные НВЛ – в виде «облака», окружающего нейтрофил или его фрагменты со всех сторон и более чем 1,5 раза больше его размера (рис. 1).

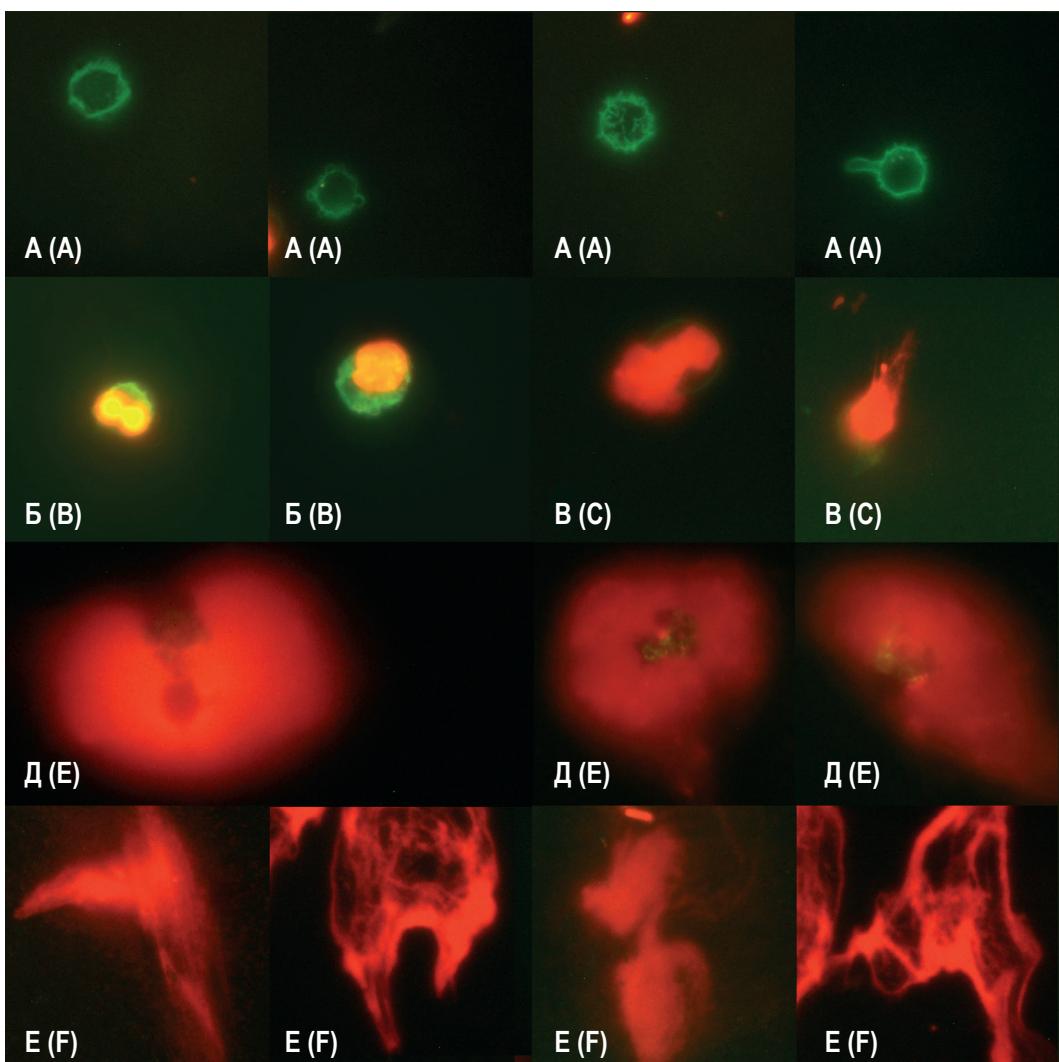


Рисунок 1. Разновидности люминесцентно-позитивных объектов, определяемых в микропрепарate после воздействия стимулятора на нейтрофильные лейкоциты

Примечание. А – интактные нейтрофилы; Б – активированные нейтрофилы; В – клетки раннего нетоза; Г – облаковидные НВЛ; Д – нитевидные НВЛ. Люминесцентная микроскопия, $\times 1000$.

Figure 1. Types of luminescence-positive objects determined in a micro preparation after stimulant exposure of neutrophil leukocytes

Note. A, intact neutrophils; B, activated neutrophils; C, early netosis cells; D, cloud-shaped NETs; E, filamentous NETs. Luminescence microscopy, $\times 1000$.

Определяли процентное отношение интактных нейтрофилов, активированных нейтрофилов, клеток раннего нетоза, нитевидных НВЛ и облаковидных НВЛ по отношению ко всем идентифицируемым люминесцентно-позитивным объектам.

Оценка характера распределения анализируемых показателей, выполненная при помощи критерия Шапиро–Уилка продемонстрировала, что их распределение отличалось от нормально-го, поэтому для анализа данных использовали непараметрические критерии. Для каждого из исследуемых показателей были определены значения медианы (Me) и межквартильного интер-

вала ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Уровень статистической значимости различий между группой отрицательного контроля, в которой стимуляция пробиотиком не проводилась и группой, в которой нейтрофилы стимулировались пробиотиком, а также между группами, в которых использовалась разная температура, при которой происходила стимуляция нейтрофилов рассчитывали с помощью U-критерия Манна–Уитни. Для оценки эффективности времени стимуляции использовали Т-критерий Вилкоксона. Данные обрабатывали в программе Statistica 10. Статистически значимым считали различия при $p < 0,05$. Воспроизводи-

мость методики оценивали, рассчитывая коэффициент вариации в 20 повторениях (CV_{20}).

Результаты

На начальном этапе исследования была разработана и испытана методика стимуляции и выявления внеклеточных ловушек, формируемых нейтрофилами. Нейтрофильные лейкоциты, выделенные из образцов периферической венозной крови здоровых волонтеров, подвергались воздействию неспецифического антигенного стимулятора – смесь бактерий *L. reuteri*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* и *B. longum*. На основании сертификата фирмы-производителя, концентрация бактерий составляла 3×10^9 колониеобразующих единиц на 63 мг препарата. С целью подбора оптимальной концентрации и объема неспецифического антигенного стимулятора, пробиотик разводили в физиологическом растворе NaCl в концентрации $2,5 \times 10^9$ бактерий на 1 мл раствора. Отношение объема стимулятора к объему взвеси нейтрофилов составляло 1:10. Стимуляция нейтрофилов бактериями в концентрации 5×10^9 бактерий на 1 мл раствора приводила к чрезмерному присутствию в препарате пропидия йодид – позитивно окрашенных бактерий. Концентрация 1×10^9 бактерий на 1 мл раствора не позволяла достигнуть необходимого уровня стимуляции – НВЛ формировались не во всех препаратах, результат оценки способности нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек был трудновоспроизводим, наблюдался большой межквартильный размах процента НВЛ в препарате.

Для выявления внеклеточных ловушек в препарате в качестве интеркалирующего красителя использовали пропидия йодид, что позволило совместить способ визуализации НВЛ с оценкой качества выделения нейтрофилов, так как известно, что пропидия йодид не проникает в клетку через неповрежденную мембрану. Для визуализации поверхности мембран нейтрофилов использовали моноклональные антитела к CD15, меченные FITC. Известно, что антиген CD15 представлен не только на поверхности нейтрофилов, но и моноцитов, макрофагов, эозинофилов, тучных клеток, миелоидных клеток предшественников, однако выполняемая процедура градиентного выделения нейтрофилов исключала участие других клеток в эксперименте. Предлагаемый подход, комбинирующий действие интеркалирующего ДНК-связывающего красителя и специфическое распознавание при помощи меченых антител, позволяет в одном поле зрения с одним набором светофильтров наблюдать морфологические эквиваленты этапов формирования НВЛ: от жизнеспособных клеток ярко-зеленого цвета

без прокрашенного ядра и активированных нейтрофилов с явлениями деконденсации ядра и повышением проницаемости клеточной мембранны до сформированных НВЛ.

Проведен сравнительный анализ различных концентраций пропидия йодида с целью определения наименьшей эффективной концентрации для окрашивания внеклеточных ловушек нейтрофилов. При внесении объема 5 мкл во взвесь нейтрофилов объемом 10 мкл оптимальная концентрация пропидия йодида составила 0,1 мг/мл – концентрация от 0,1 мг/мл и выше позволяла уверенно визуализировать нити ДНК, выброшенные нейтрофилом, а снижение концентрации красителя ниже 0,1 мг/мл ухудшало качество визуализации. В частности, происходило снижение интенсивности флюoresценции внеклеточных структур.

Инкубация с моноклональными антителами к CD15 мечеными FITC продемонстрировала оптимальный результат окрашивания при разведении 0,9%-ным раствором NaCl 1:10. Разведение в соотношении больше чем 1:10 снижало качество флюoresценции интактных нейтрофилов, а разведение в соотношении меньше чем 1:10 позволяло выявлять интактные нейтрофилы с сопоставимым качеством, но с большим расходом реактива.

По достижении приемлемых результатов в стимуляции нейтрофилов и в визуализации НВЛ проведены эксперименты для определения оптимальных условий исследования способности нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек. С этой целью на втором этапе был определен оптимальный температурный режим и время стимуляции изолированных нейтрофилов. При сравнении процесса формирования внеклеточных ловушек при комнатной температуре (20–22 °C) и при 37 °C статистически значимые различия в содержании НВЛ наблюдались при температуре 37 °C (табл. 1). Таким образом, температура 37 °C была принята оптимальной для формирования нейтрофилом НВЛ в настоящем исследовании.

Кроме того, было подобрано время стимуляции нейтрофилов (табл. 1). Содержание НВЛ через 15 мин после воздействия стимулятора было значимо выше, чем через 5 мин, однако процент сформировавшихся НВЛ оставался незначительным. Значительный прирост доли НВЛ наблюдался через 30 мин после воздействия стимулятора. При этом статистически значимых различий в содержании НВЛ между временем стимуляции 30 мин и 45 мин не было выявлено. В результате проведенного этапа исследования был сделан вывод о том, что 30 мин инкубации нейтрофилов с неспецифическим антигенным стимулятором

ТАБЛИЦА 1. СПОСОБНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ К ФОРМИРОВАНИЮ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ И ВРЕМЕНИ ВОЗДЕЙСТВИЯ СТИМУЛЯТОРА ПРИ ВНЕСЕНИИ В СРЕДУ С НЕЙТРОФИЛАМИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО РАСТВОРА ХЛОРИДА НАТРИЯ (ГРУППА 1, n = 15) ИЛИ ПРОБИОТИКА (ГРУППА 2, n = 15), Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. ABILITY OF NEUTROPHILS TO FORM EXTRACELLULAR TRAPS IN DEPENDENCE ON TEMPERATURE AND TIME OF STIMULANT EXPOSURE WHEN PHYSIOLOGICAL SODIUM CHLORIDE SOLUTION (GROUP 1, n = 15) OR PROBIOTIC (GROUP 2, n = 15) WAS ADDED TO THE FLUID WITH NEUTROPHILS, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Группа Group	Условия Conditions	Интактные нейтрофилы Intact neutrophil	Активированные нейтрофилы Activated neutrophil	Клетки раннего нетоза Early netosis cells	Облаковидные НВЛ Cloud-shaped NETs	Нитевидные НВЛ Filamentous NETs
Способность нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек в зависимости от температуры Ability of neutrophils to form extracellular traps depending on temperature						
1	22 °C	84,4 (77,8-86,2)	9,6 (5,8-11,9)	3,7 (2,1-5,0)	1,1 (0,9-2,0)	2,0 (1,7-3,0)
2	22 °C	67,2 (55,5-73,5) $p_{rp1} < 0,0001^*$	20,3 (16,4-25,3) $p_{rp1} < 0,0001^*$	4,4 (3,2-6,1)	4,7 (4,0-7,1) $p_{rp1} < 0,0001^*$	2,2 (2,0-4,0)
1	37 °C	83,1 (77,4-86,4)	9,8 (7,5-11,8)	3,1 (2,2-4,8)	1,7 (0,9-2,1)	1,9 (1,7-2,5)
2	37 °C	62,1 (51,2-65,2) $p_{rp1} < 0,0001^*$; $p_{22-37} = 0,0367^*$	20,5 (16,3-25,8) $p_{rp1} = 0,0001^*$	4,4 (3,7-6,2) $p_{rp1} = 0,0367^*$	5,1 (4,3-7,2) $p_{rp1} < 0,0001^*$	8,6 (7,4-10,1) $p_{rp1} < 0,0001^*$; $p_{22-37} < 0,0001^*$
Способность нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек в зависимости от времени инкубации Ability of neutrophils to form extracellular traps depending on incubation time						
1	5 МИН 5 min	83,1 (77,4-86,3)	9,9 (7,8-11,9)	3,0 (2,3-5,0)	2,0 (0,8-2,8)	2,0 (1,7-2,2)
2	5 МИН 5 min	82,3 (81,4-84,4)	10,1 (9,9-12,0)	3,1 (1,8-5,0)	1,8 (1,1-2,1)	2,1 (1,7-3,2)
1	15 МИН 15 min	82,3 (77,2-86,7)	9,8 (7,4-11,8)	3,0 (2,2-4,7)	1,8 (0,8-2,3)	2,2 (1,7-2,4)
2	15 МИН 15 min	80,8 (78,1-82,6)	10,1 (9,8-11,9)	2,7 (2,1-5,0)	1,8 (0,9-2,3)	4,1 (3,1-5,1) $p_{rp1} = 0,0014^*$; $p_{5'} = 0,0023^{**}$
1	30 МИН 30 min	82,6 (76,8-86,7)	10,2 (7,6-11,9)	3,2 (2,2-4,6)	1,6 (0,9-2,1)	2,0 (1,7-2,1)
2	30 МИН 30 min	62,4 (51,5-65,1) $p_{rp1} < 0,0001^*$; $p_5' < 0,0001^{**}$; $p_{15'} < 0,0001^{**}$	20,1 (15,9-25,5) $p_{rp1} = 0,0002^*$; $p_5' < 0,0001^{**}$; $p_{15'} < 0,0001^{**}$	4,6 (3,4-6,3) $p_{rp1} = 0,0453^*$; $p_5' = 0,0453^{**}$; $p_{15'} = 0,0367^{**}$	5,0 (4,4-7,1) $p_{rp1} < 0,0001^*$; $p_5' < 0,0001^{**}$; $p_{15'} < 0,0001^{**}$	8,8 (7,3-10,5) $p_{rp1} < 0,0001^*$; $p_5' < 0,0001^{**}$; $p_{15'} < 0,0001^{**}$
1	45 МИН 45 min	84,3 (77,7-85,9)	9,0 (7,2-13,0)	3,3 (2,0-5,0)	1,3 (0,9-2,2)	1,8 (1,3-3,3)
2	45 МИН 45 min	62,2 (51,1-65,0) $p_{rp1} < 0,0001^*$; $p_5' < 0,0001^{**}$; $p_{15'} < 0,0001^{**}$	20,1 (16,3-25,6) $p_{rp1} < 0,0001^*$; $p_5' < 0,0001^{**}$; $p_{15'} < 0,0001^{**}$	4,5 (3,7-6,3) $p_5' = 0,0408^{**}$; $p_{15'} = 0,0408^{**}$	5,1 (3,9-7,0) $p_{rp1} < 0,0001^*$; $p_5' < 0,0001^{**}$; $p_{15'} < 0,0001^{**}$	8,7 (6,9-10,6) $p_{rp1} < 0,0001^*$; $p_5' < 0,0001^{**}$; $p_{15'} < 0,0001^{**}$
1	60 МИН 60 min	84,1 (79,3-86,9)	9,5 (7,3-14,8)	3,2 (2,2-3,8)	1,2 (0,8-1,8)	1,6 (1,2-2,0)
2	60 МИН 60 min	64,0 (50,8-68,8) $p_{rp1} < 0,0001^*$; $p_5' < 0,0001^{**}$; $p_{15'} < 0,0001^{**}$	21,4 (10,3-30,2) $p_{rp1} = 0,0027^*$; $p_5' = 0,0032^{**}$; $p_{15'} = 0,0032^{**}$	4,3 (1,8-6,2)	5,0 (4,0-7,3) $p_{rp1} < 0,0001^*$; $p_5' < 0,0001^{**}$; $p_{15'} < 0,0001^{**}$	7,7 (6,8-10,0) $p_{rp1} < 0,0001^*$; $p_5' < 0,0001^{**}$; $p_{15'} < 0,0001^{**}$

Примечание. Таблица составлена авторами. * – по У-критерию Манна–Уитни; ** – по критерию Вилкоксона. НВЛ – нейтрофильные внеклеточные ловушки; p_{rp1} – уровень значимости р по отношению к группе 1 при тех же условиях; p_{22-37} – уровень значимости р по отношению к аналогичной группе при 22 °C; p_5' , $p_{15'}$ – уровень значимости р по отношению к времени инкубации 5 и 15 мин соответственно.

Note. The table was compiled by the authors. *, by the Mann–Whitney U test; **, by the Wilcoxon test. NET, neutrophil extracellular traps; p_{rp1} , p significance level relative to group 1 under the same conditions; p_{22-37} , p significance level relative to the same group at 22 °C; p_5' , $p_{15'}$, p significance level relative to incubation times of 5 and 15 minutes, respectively.

достаточно для эффективного формирования НВЛ у здоровых волонтеров.

Таким образом, итоговый вид методики определения способности нейтрофилов к формированию НВЛ выглядит следующим образом:

1. Необходимо выделить нейтрофилы на растворе фиколла-верографина (градиент плотности 1,077-1,105 г/мл) [12]. Собранные нейтрофилы дважды отмыть физиологическим раствором натрия хлорида и довести концентрацию клеток до показателя 5×10^6 клеток на 1 мл, добавляя необходимый для этого объем 1%-ного раствора альбумина в растворе Хенкса.

2. В две пробирки типа Eppendorf внести по 200 мкл полученной взвеси клеток. В пробирку № 1 добавить 20 мкл физиологического раствора NaCl, а в пробирку № 2 – 0,9%-ный раствор NaCl, содержащий $2,5 \times 10^9$ бактерий пробиотика на 1 мл раствора. Обе пробирки инкубировать в течение 30 мин при 37 °C.

3. После инкубации приготовить препарат «раздавленная капля». На предметное стекло настристи 7 мкл исследуемой взвеси клеток, добавить 2,5 мкл пропидия йодида в концентрации 0,1 мг/мл и 3,5 мкл моноклональных антител к CD15, меченных FITC, в разведении 0,9%-ным раствором NaCl – 1:10. Каплю медленно и аккуратно накрыть покровным стеклом 24 × 48 × 0,17 мм. Инкубировать препарат на водяной бане при 37 °C в течение 5 мин.

4. Препарат исследовать методом люминесцентной микроскопии с применением комбинации светофильтров, имеющей следующие характеристики: возбуждение флуоресценции при длине волны 450-480 нм и эмиссия при длине волны от 515 нм. Визуализировать и подсчитать абсолютное количество: 1) нитевидных НВЛ; 2) облаковидных НВЛ; 3) клеток раннего нетоза; 4) активированных нейтрофилов; 5) интактных нейтрофилов. Рассчитать процентное отношение каждого из объектов, обнаруженных в препарате относительно суммы всех люминесцентно-позитивных объектов в препарате.

Разработанный протокол был защищен патентом на изобретение (№ 2768152 С1, Российская Федерация).

Воспроизводимость методики в настоящей работе оценивали путем одновременного анализа одного и того же образца отмытых лейкоцитов. Исследование проводили пять специалистов, в четырех постановках. Коэффициент вариации между сериями исследований (CV_{20}) составил 13,8% для нитевидных НВЛ и 15,2% для облаковидных НВЛ. Полученные значения близки к предельно допустимому значению коэффициента вариации ($CV_{20} = 12,5\%$), установленный для близкого по биологическому смыслу показателя

«Гранулоциты, подсчет в крови» в соответствии с приказом Минздрава РФ от 7 февраля 2000 г. № 45 «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации».

Обсуждение

Предлагаемый нами метод исследования был применен в различных группах пациентов, имеющих определенную инфекционную и неинфекционную патологию. Результаты оценки способности нейтрофилов к образованию НВЛ у представителей обследуемых когорт позволяют сделать вывод о достаточном уровне чувствительности и манифестности регистрируемых с помощью данной методики показателей. В частности у детей и взрослых, больных туберкулезом, была выявлена повышенная способность нейтрофилов к образованию НВЛ по сравнению со здоровыми добровольцами соответствующих возрастных групп [3, 4, 5]. Следует отметить, что у детей с различными формами туберкулеза формирование НВЛ *ex vivo* имело свои особенности. Так, у пациентов с первичным туберкулезным комплексом нейтрофилы преимущественно образовывали нитевидные НВЛ, тогда как у детей с туберкулезом внутригрудных лимфатических узлов после неспецифической антигенной стимуляции преобладали облаковидные НВЛ [6]. У взрослых пациентов с тяжелым течением туберкулезной инфекции, характеризующимся большей распространенностью инфильтративного процесса и наличием распада, доля облаковидных и нитевидных НВЛ была статистически значимо выше, чем у пациентов с туберкулезом без распада [3]. При этом у взрослых с туберкулезной инфекцией преобладали НВЛ облаковидного типа, которые, по мнению некоторых исследователей, ассоциированы с иммунопатологическими процессами [16].

Изменения в способности нейтрофилов к формированию НВЛ были обнаружены у пациентов с язвенным колитом [2]. Интересные данные были получены при исследовании культур нейтрофилов у детей с аневризмальными костными кистами. Нейтрофилы периферической крови демонстрировали отсутствие или низкую способность к образованию НВЛ, тогда как нейтрофилы, извлеченные из крови, заполняющей костный дефект, активно формировали НВЛ. Это позволяет предположить, что модуляция образования НВЛ может играть важную роль в обеспечении межклеточного взаимодействия и пролиферации клеток, необходимых для закрытия полости аневризмальной костной кисты у детей [13]. Кроме того, исследования выявили

высокую степень корреляции между образованием нитевидных НВЛ и концентрацией цитруллинированного гистона H3 ($r = 0,86$; $p = 0,0137$), определенной методом ИФА в образцах периферической крови [8].

Заключение

Таким образом, предложенная методика позволяет оценить способность нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек, которая

может варьировать в зависимости от типа патологии и степени ее тяжести. Анализ особенностей неспецифического клеточного иммунитета, в частности изменений способности нейтрофилов к процессу нетоза, в сочетании с другими общепринятыми диагностическими методами, может стать технически несложным, эффективным и практически применимым инструментом для мониторинга в динамике заболеваний, прогнозирования их течения и оценки эффективности терапии.

Список литературы / References

1. Кассина Д.В., Василенко И.А., Гурьев А.С., Волков А.Ю., Метелин В.Б. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: значение для диагностики и прогноза COVID-19 // Альманах клинической медицины, 2020, № 48 (S1). С. S43-S50. [Kassina D.V., Vasilenko I.A., Gur'ev A.S., Volkov A.Yu., Metelin V.B. Neutrophil extracellular traps: diagnostic and prognostic value in COVID-19. *Almanakh klinicheskoy meditsiny = Almanac of Clinical Medicine*, 2020, no. 48 (S1), pp. S43-S50. (In Russ.)]
2. Ливзан М.А., Бикбавова Г.Р., Новиков Д.Г., Золотов А.Н., Кириченко Н.А., Пахтусова П.О., Михалева Л.В. Оценка нетозобразующей способности нейтрофилов у пациентов с язвенным колитом // Медицинский алфавит, 2023, № 18. С. 23-27. [Livzan M.A., Bikbavova G.R., Novikov D.G., Zolotov A.N., Kirichenko N.A., Pakhtusova P.O., Mikhaleva L.V. Assessment of neutrophil nets-forming activity in patients with ulcerative colitis. *Meditinskij alfavit = Medical Alphabet*, 2023, no. 18, pp. 23-27. (In Russ.)]
3. Мордык А.В., Золотов А.Н., Новиков Д.Г., Кириченко Н.А., Пахтусова П.О., Птухин А.О. Нетозоформирующая способность нейтрофилов у пациентов с ограниченным и распространенным туберкулезным процессом // Туберкулез и болезни легких, 2023. Т. 101, № 3. С. 78-86. [Mordyk A.V., Zolotov A.N., Novikov D.G., Kirichenko N.A., Pakhtusova P.O., Ptukhin A.O. Netosis-forming ability of neutrophils in patients with limited and disseminated tuberculous lesions. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Diseases*, 2023, Vol. 101, no. 3, pp. 78-86. (In Russ.)]
4. Мордык А.В., Золотов А.Н., Новиков Д.Г., Романова М.А., Индутный А.В., Кириченко Н.А., Птухин А.О. Возрастные особенности формирования внеклеточных ловушек нейтрофилов у здоровых лиц и больных туберкулезом // Вестник современной клинической медицины, 2023. Т. 16, № 6. С. 37-45. [Mordyk A.V., Zolotov A.N., Novikov D.G., Romanova M.A., Indutny A.V., Kirichenko N.A., Ptukhin A.O. Age-related differences of forming neutrophil extracellular traps in healthy individuals and in tuberculosis patients. *Vestnik sovremennoj klinicheskoy meditsiny = Bulletin of Contemporary Clinical Medicine*, 2023, Vol. 16, no. 6, pp. 37-45. (In Russ.)]
5. Мордык А.В., Золотов А.Н., Новиков Д.Г., Романова М.А., Кириченко Н.А., Птухин А.О. Нетозообразующая 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 A.V., Zolotov A.N., Novikov D.G., Romanova M.A., Kirichenko N.A., Ptukhin A.O. 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, Vol. 18, no. 5, pp. 7-12. (In Russ.)]
6. Мордык А.В., Новиков Д.Г., Золотов А.Н., Романова М.А., Кириченко Н.А., Птухин А.О., Самусева Н.Л. Способность нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек у детей с первичным туберкулезным комплексом и туберкулезом внутргрудных лимфатических узлов // Вопросы практической педиатрии, 2024. Т. 19, № 5. С. 46-53. [Mordyk A.V., Novikov D.G., Zolotov A.N., Romanova M.A., Kirichenko N.A., Ptukhin A.O., Samuseva N.L. Ability of neutrophils to form extracellular traps in children with primary tuberculosis complex and intrathoracic lymph node tuberculosis. *Voprosy prakticheskoy pediatrii = Clinical Practice in Pediatrics*, 2024, Vol. 19, no. 5, pp. 46-53. (In Russ.)]
7. Насонов Е.Л., Авдеева А.С., Решетняк Т.М., Алексанкин А.П., Рубцов Ю.П. Роль нетоза в патогенезе иммуновоспалительных ревматических заболеваний // Научно-практическая ревматология, 2023. Т. 61, № 5. С. 513-530. [Nasonov E.L., Avdeeva A.S., Reshetnyak T.M., Aleksankin A.P., Rubtsov Yu.P. The role of NETosis in the pathogenesis of immunoinflammatory rheumatic diseases. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2023, Vol. 61, no. 5, pp. 513-530. (In Russ.)]
8. 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. Т. 23, № 4. С. 95-104. [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. *Byulleten sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2024, Vol. 23, no. 4, pp. 95-104. (In Russ.)]

9. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 2004, Vol. 303, no. 5663, pp. 1532-1535.
10. Inozemtsev V., Sergunova V., Vorobjeva N., Kozlova E., Sherstyukova E., Lyapunova S., Chernysh A. Stages of NETosis Development upon Stimulation of Neutrophils with Activators of Different Types. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, Vol. 24, no. 15, 12355. doi: 10.3390/ijms241512355.
11. Konig M.F., Andrade F. A critical reappraisal of neutrophil extracellular traps and NETosis mimics based on differential requirements for protein citrullination. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, 461. doi: 10.3389/fimmu.2016.00461.
12. Oh H., Siano B., Diamond S. Neutrophil isolation protocol. *J. Vis. Exp.*, 2008, no. 17, 745. doi: 10.3791/745.
13. Pisklakov A.V., Novikov D.G., Zolotov A.N., Palianov K.V., Korobeinikov M.M., Ponomarev V.I., Kalinichev A.G., Lysov A.V. Netosis as a process involved in the consolidation of aneurysmal bone cysts in children using hemostatic agents. *Medical News of North Caucasus*, 2024, Vol. 19, no. 2, pp. 111-116.
14. Sergunova V., Inozemtsev V., Vorobjeva N., Kozlova E., Sherstyukova E., Lyapunova S., Chernysh A. Morphology of Neutrophils during Their Activation and NETosis: Atomic Force Microscopy Study. *Cells*, 2023, Vol. 12, no. 17, 2199. doi: 10.3390/cells12172199.
15. Stoimenou M., Tzoros G., Skendros P., Chrysanthopoulou A. Methods for the Assessment of NET Formation: From Neutrophil Biology to Translational Research. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 23, no. 24, 15823. doi: 10.3390/ijms232415823.
16. Yousefi S., Simon H.U. NETosis – Does It Really Represent Nature's "Suicide Bomber"? *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, 328. doi: 10.3389/fimmu.2016.00328.

Авторы:

Новиков Д.Г. – к.м.н., доцент, доцент кафедры клинической лабораторной диагностики дополнительного профессионального образования, заведующий центральной научно-исследовательской лабораторией ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Омск, Россия

Золотов А.Н. – к.м.н., доцент, старший научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории, доцент кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Омск, Россия

Савочкина А.Ю. – д.м.н., доцент, заведующая кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии, директор Научно-исследовательского института иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Индутный А.В. – д.м.н., доцент, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики дополнительного профессионального образования ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Омск, Россия

Корпачева О.В. – д.м.н., профессор, проректор по научно-исследовательской работе, заведующая кафедрой патофизиологии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Омск, Россия

Кириченко Н.А. – ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики дополнительного профессионального образования, младший научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Омск, Россия

Поступила 24.02.2025
Отправлена на доработку 28.02.2025
Принята к печати 23.03.2025

Authors:

Novikov D.G., PhD (Medicine), Associate Professor, Associate Professor of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics of Continuing Professional Education, Head of the Central Research Laboratory, Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation

Zolotov A.N., PhD (Medicine), Associate Professor, Senior Researcher of the Central Research Laboratory; Associate Professor of the Department of Pathophysiology, Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation

Savochkina A.Yu., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, Director of the Research Institute of Immunology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Indutny A.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Clinical Laboratory Diagnostics of Continuing Professional Education, Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation

Korpacheva O.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Vice-Rector for Research, Head, Department of Pathophysiology, Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation

Kirichenko N.A., Assistant Professor of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics of Continuing Professional Education, Junior Researcher of the Central Research Laboratory, Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation

Received 24.02.2025
Revision received 28.02.2025
Accepted 23.03.2025