

## **ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ДНК В КРОВИ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ *IN VIVO***

**Демченко Е.Н., Гаврилова Е.Д., Гойман Е.В., Вольский Н.Н.,  
Колесникова О.П., Козлов В.А.**

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,  
г. Новосибирск, Россия

**Резюме.** Повышенная концентрация внеклеточной ДНК (внДНК) в циркулирующей крови человека и животных является признаком воспалительных состояний и отличительной характеристикой различных патофизиологических процессов, протекающих в организме. Цель – исследовать возможную роль фактора некроза опухоли (TNF $\alpha$ ) в изменениях содержания внДНК периферической крови в ответ на экспериментально созданную ситуацию системного воспаления. В работе использовали 40 самок мышей-гибридов (C57Bl/6хDBA/2)F<sub>1</sub> в возрасте 6-8 недель. Концентрацию внДНК, и ее отдельных фракций, определяли с помощью флуоресцентного красителя PicoGreen. Динамику воспалительного процесса оценивали через 4, 8, 11 и 24 часа после введения LPS.

Показан значимый рост уровня внДНК плазмы крови при одновременном падении уровня внДНК связанной с поверхностью клеток под действием липополисахарида *E. coli* (LPS). Отношение количества внДНК, связанной с поверхностью клеток, к суммарной внДНК дозозависимо снижается уже через 4 часа после введения животным LPS, что позволяет считать это соотношение характерным признаком нетоза нейтрофильных гранулоцитов при развитии острого воспаления. При одновременном введении с LPS рекомбинантного белка, нейтрализующего действие TNF $\alpha$ , описанные эффекты существенно подавляются, в то время как увеличенное поступление нейтрофилов в ткани определяются неким иным фактором, прямо не связанным с продукцией этого цитокина.

На основании полученных данных предлагается гипотеза о том, что индукция нетоза воспалительными стимулами вызывает увеличение концентрации внДНК в плазме крови не только за счет вновь возникающей при нетозе нейтрофилов экстрацеллюлярной ДНК, но и вследствие освобождения, под действием выделяющихся при нетозе протеаз, той фракции внДНК, которая ранее была прочно связана с мембранами клеток во всех тканях организма.

*Ключевые слова:* внеклеточная ДНК, воспаление, нетоз, LPS, TNF-связывающий белок

### **Адрес для переписки:**

Гаврилова Елена Давидовна  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт  
фундаментальной и клинической иммунологии»  
630099, Россия, г. Новосибирск,  
ул. Ядринцевская, 14, каб. 15.  
Тел.: 8 (383) 222-04-38.  
Факс: 8 (383) 222-70-28.  
E-mail: edav.gavr@mail.ru

### **Address for correspondence:**

Gavrilova Elena D.  
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology  
630099, Russian Federation, Novosibirsk,  
Yadrintsevskaya str., 14, room 15.  
Phone: 7 (383) 222-04-38.  
Fax: 7 (383) 222-70-28.  
E-mail: edav.gavr@mail.ru

### **Образец цитирования:**

Е.Н. Демченко, Е.Д. Гаврилова, Е.В. Гойман,  
Н.Н. Вольский, О.П. Колесникова, В.А. Козлов  
«Внеклеточная ДНК в крови как показатель  
воспалительной реакции *in vivo*» // Медицинская  
иммунология, 2022. Т. 24, № 4. С. 853-860.  
doi: 10.15789/1563-0625-EDI-2504  
© Демченко Е.Н. и соавт., 2022

### **For citation:**

E.N. Demchenko, E.D. Gavrilova, E.V. Goiman,  
N.N. Volsky, O.P. Kolesnikova, V.A. Kozlov "Extracellular  
DNA in blood: an index of *in vivo* inflammatory response",  
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,  
2022, Vol. 24, no. 4, pp. 853-860.  
doi: 10.15789/1563-0625-EDI-2504  
DOI: 10.15789/1563-0625-EDI-2504

## EXTRACELLULAR DNA IN BLOOD: AN INDEX OF *IN VIVO* INFLAMMATORY RESPONSE

Demchenko E.N., Gavrilova E.D., Goiman E.V., Volsky N.N.,  
Kolesnikova O.P., Kozlov V.A.

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Abstract.** Increased concentration of cell-free DNA (cfDNA) in the circulating blood of humans and animals is a sign of inflammatory conditions and a distinctive characteristic of various pathophysiological processes in the body. The aim of the present study was to investigate the possible role of tumor necrosis factor (TNF $\alpha$ ) in changes of cfDNA contents in peripheral blood as a response to experimentally induced systemic inflammation.

We used 40 female hybrid mice (C57Bl/6xDBA/2) F1 at the age of 6–8 weeks. The concentration of cfDNA and its individual fractions was determined using a PicoGreen fluorescent dye. The dynamics of inflammatory process was evaluated after 4, 8, 11 and 24 hours following LPS injection. A significant increase in the blood plasma cfDNA levels was shown under the action of *E. coli* lipopolysaccharide (LPS), along with simultaneous decreased levels of cfDNA, associated with cell surface. The ratio of cell surface-bound cfDNA to the total cfDNA contents was reduced in dose-dependent manner as early as 4 hours after LPS injection to the animals, thus allowing us to consider this ratio a characteristic sign of netosis of neutrophilic granulocytes during the development of acute inflammation. The described effects are significantly suppressed with co-injection of recombinant TNF $\alpha$  neutralizing protein along with LPS, whereas increased intake of neutrophils in the tissues is determined by some other factors which are not directly related to the production of this cytokine.

Based on the obtained data, we proposed a following hypothesis: induction of netosis by inflammatory stimuli causes an increase in the concentration of cfDNA in blood plasma not only due to *de novo* emerging extracellular DNA by neutrophil netosis, but also by the release of distinct cfDNA fraction that was previously firmly bound to cell membranes in multiple body tissues under the action of proteases released during netosis.

**Keywords:** extracellular DNA, inflammation, netosis, LPS, TNF $\alpha$  binding protein

Исследование выполнено за счет средств федерального бюджета для выполнения государственного задания на научно-исследовательские работы «Молекулярно-генетические и эпигенетические механизмы регуляции иммунного ответа в норме и патологии» (ПК № 01201356997) и «Изучение иммунопатогенеза фенотипов социально значимых заболеваний человека и полиморбидности как основа для разработки новых методов персонализированной диагностики и лечения» (ПК № 122012000366-9).

### Введение

На основании исследований последних десятилетий было сформировано устойчивое представление о том, что концентрация внеклеточной ДНК (внДНК) в циркулирующей крови человека и животных может быть использована как показатель динамики различных патофизиологических процессов, протекающих в организме. Так, в частности, было обнаружено, что ее содержание в плазме и на поверхности клеток крови существенно изменяется у пациентов с различными

видами опухолей [1, 5], при сепсисе [9], при заболеваниях, обусловленных нарушениями деятельности иммунной системы [1], при инфаркте миокарда [3] и при развитии других патологических состояний. Нами было показано, что у мышей с хронической реакцией «трансплантат против хозяина» динамика содержания внДНК в плазме крови может служить прогностическим показателем, оценивающим вероятность развития того или иного варианта иммунопатологии [2].

Важным источником поступающей в кровь внДНК предполагается процесс так называемого «нетоза» нейтрофильных лейкоцитов [9], который резко увеличивается под влиянием воспалительных стимулов и заключается в пермебилизации клеточных мембран с выходом ядерного материала и содержимого гранул за пределы клетки с формированием специфической «сети», образованной нитями хроматина в комплексе с разнообразными белками, в том числе гидролитическими ферментами. Такая сеть способна адсорбировать на своих нитях бактериальные частицы, обездвигивая их и вызывая их лизис,

так что нетоз играет роль одного из врожденных механизмов неспецифического иммунитета. Показано [11], что при индукции у животных воспалительной реакции повышение уровней внДНК в плазме крови развивается параллельно увеличению концентрации миелопероксидазы, специфичной для нейтрофильных лейкоцитов, свидетельствуя, что значительная часть регистрируемой в плазме крови внДНК появляется в результате массового нетоза нейтрофилов. Ранее полученные нами данные [2] также указывают, что показатели активации нейтрофильного звена неспецифического иммунитета увеличиваются совместно с нарастанием в плазме крови концентрации внДНК.

Однако конкретные патофизиологические механизмы, обуславливающие изменения концентрации внДНК в крови при системной воспалительной реакции и связывающие этот параметр с другими показателями нейтрофильного ответа на провоспалительные агенты, изучены еще далеко не полностью. **Целью настоящей работы** было исследование возможной роли фактора некроза опухоли (TNF $\alpha$ ) в изменениях содержания внДНК периферической крови в ответ на экспериментально созданную ситуацию системного воспаления. В качестве воспалительного стимула был выбран липополисахарид *E. coli* (LPS) в дозе, вызывающей достаточно выраженную, но краткую воспалительную реакцию организма, а роль TNF $\alpha$  оценивалась с помощью параллельного введения экспериментальной группе мышей белка, нейтрализующего эффекты TNF $\alpha$  за счет наличия в своем составе TNF $\alpha$ -связывающего домена белка CRMB вируса натуральной оспы [4].

Полученные результаты свидетельствуют о разнонаправленном влиянии индуктора воспаления на содержание различных фракций внДНК в циркулирующей крови и о существенном участии TNF $\alpha$  в этом процессе, что позволяет сформулировать некоторые нетривиальные предположения о механизме увеличения концентрации внДНК в плазме крови при воспалительных реакциях и о роли в этом нетоза нейтрофильных лейкоцитов.

## Материалы и методы

В работе использовали самок мышей-гибридов (C57Bl/6хDBA/2)F<sub>1</sub> в возрасте 6–8 недель, полученных из экспериментально-биологической клиники лабораторных животных НИИФКИ. Животных содержали в стандартных условиях вивария в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных целей (Страсбург, 1986). Исследование одобрено эти-

ческим комитетом НИИФКИ (протокол № 92 от 10.11.2015 г.)

Животным экспериментальных групп однократно в/б вводили LPS *E. coli* штамма 111:B4 (Sigma, США) в дозах 10 нг/мышь, 1 мкг/мышь и 100 мкг/мышь, животным контрольных групп вводился соответствующий объем PBS. В одной из групп мышам за 30 мин до инъекции LPS вводили TNF $\alpha$ -связывающий белок (anti-TNF) в дозе 10 нг/мышь. У всех животных до введения LPS (нулевая точка) было определено количество лейкоцитов в крови, а также концентрация внДНК в плазме крови и внДНК, связанной с цитоплазматическими мембранами клеток крови. Динамику воспалительного ответа оценивали через 4, 8, 11, 24 часа после введения LPS по тем же параметрам.

Выделение и количественное определение внДНК проводили согласно методике [10]. Кровь из хвостовой вены животных собирали в пробирки, содержащие 3 × PBS (PBS-10 мМ фосфатный буфер pH 7,4, 0,15 М NaCl) и 15 мМ ЭДТА в качестве антикоагулянта. Плазму отделяли центрифугированием при 400 g в течение 20 мин. К осажденным клеткам добавляли девятикратный объем PBS с 5 мМ ЭДТА, супернатант отделяли центрифугированием при 400 g в течение 20 мин. Для определения внДНК, связанной с клеточной поверхностью, клетки инкубировали 5 мин с 0,25% раствором трипсина, реакцию останавливали добавлением ингибитора трипсина из соевых бобов (Sigma, США) и центрифугированием отделяли супернатант, содержащий внДНК. Выделение ДНК из полученных фракций проводили на колонках компании «БиоСилика» (г. Новосибирск) согласно прилагаемой инструкции. Определение ДНК проводили с помощью флуоресцентного красителя PicoGreen (Invitrogen, США). ДНК рассчитывалась по калибровочной кривой, построенной для известных концентраций стандартной двухцепочечной  $\lambda$  ДНК.

Статистическую обработку результатов проводили, используя тест Манна–Уитни и ранговый коэффициент корреляции Спирмена, с помощью программы Statistica 6.0. Данные представлены в виде средних значений для каждой из экспериментальных групп животных. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

В качестве простейшей модели, позволяющей исследовать влияние воспаления на уровни внДНК в периферической крови животных, было выбрано однократное введение LPS в умеренной дозе (1 мкг/мышь). Ранее [2] было показано, что такая доза LPS вызывает повышение характерных для воспалительной реакции пока-

зателей (лейкоцитоза и соотношения «нейтрофилы/лимфоциты»), и при этом эффекты ее введения ограничены во времени — через 24 часа после инъекции параметры возвращаются к нормальному уровню. На рисунке 1 графически представлены суммарные результаты двух аналогичных экспериментов, отражающие влияние LPS на уровни вДНК в крови животных в различные сроки после его введения. В качестве отдельных параметров, описывающих различные фракции вДНК, было определено: количество вДНК в ЭДТА-плазме (ЭДТА играет роль антикоагулянта и ингибитора нуклеаз) (рис. 1А), количество вДНК, прочно связанной с белками на поверхности цитоплазматических мембран клеток крови и переходящей в раствор лишь под действием протеолитического фермента (рис. 1Б) и суммарное количество вДНК, рассчитываемое как результат сложения двух предыдущих показателей (рис. 1В).

Видно, что, в то время как суммарное количество находящейся в крови вДНК не обнаруживает определенной динамики и существенно не изменяется после введения LPS, значения двух других измеренных параметров закономерно изменяются во времени и демонстрируют статистически подтверждаемое влияние воспалительной реакции на их величину. Первое, что следует здесь отметить, это противоположность эффектов инъекции LPS на значения вДНК плазмы и вДНК, связанной с поверхностью клеток. Можно сказать, что два этих параметра находятся — в данной модели — в противофазе: LPS явно увеличивает количество вДНК плазмы, и в то же время развитие воспаления приводит к существенному уменьшению той фракции вДНК, которая прочно (и, вероятно, ковалентно) связана с мембранными белками клеточной поверхности. На рисунке 2 показана динамика соотношения между вДНК, связанной с мембранами клеток, и суммарной вДНК крови при развитии ответа на LPS. Видно, что этот показатель дозозависимо снижается уже через 4 часа после введения препарата (рис. 2А) и что при дозе 1 мкг/мышь снижение данного показателя сохраняется в течение суток после инъекции LPS (рис. 2Б).

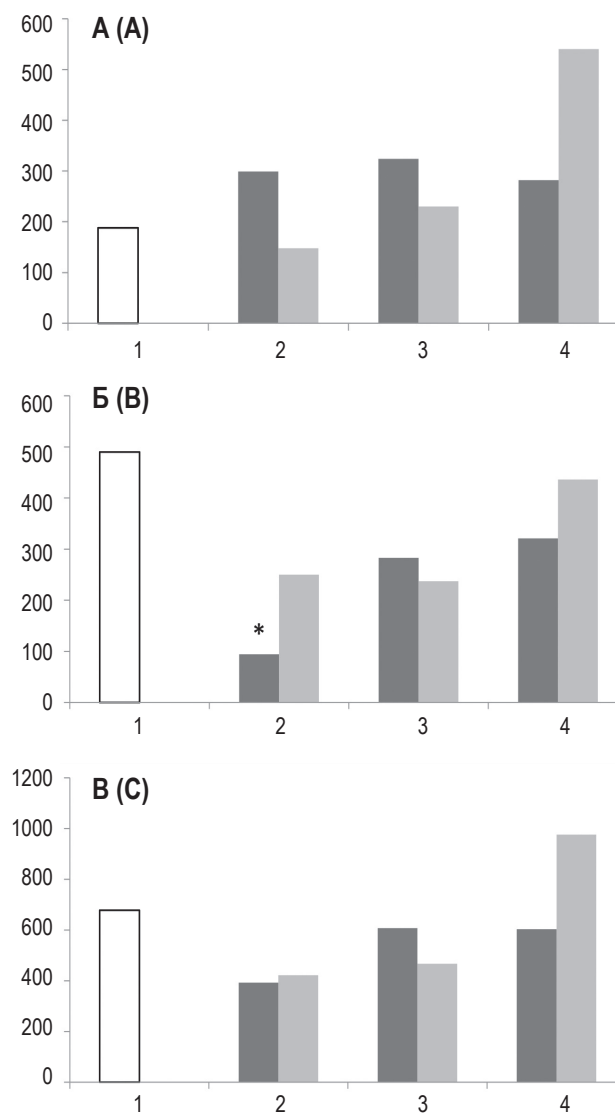
О противоположном по знаку влиянии воспаления на разные фракции вДНК говорит и наличие умеренной отрицательной корреляции между вДНК плазмы и долей вДНК, связанной с клеточной поверхностью, во всей вДНК крови: коэффициент корреляции ( $\rho$ ) между этими параметрами после введения LPS равен  $-0,45$ . При этом можно считать, что такая отрицательная корреляция между исследуемыми параметрами усиливается при развертывании воспалительной реакции организма на вводимый животным

LPS, поскольку у интактных мышей (без введения LPS) связь между этими параметрами существенно ниже ( $\rho = -0,31$ ).

На графиках, представленных на рисунке 1, приведены также данные, характеризующие влияние на исследуемые параметры специфического белка, вводимого мышам одной из групп непосредственно перед инъекцией LPS и частично отменяющего те эффекты воспалительного агента, которые опосредуются стимуляцией продукции TNF $\alpha$  в организме животного. Сравнивая черные (группа с введением только LPS) и серые (группа с введением LPS + anti-TNF) столбцы, можно наглядно убедиться, что нейтрализующий TNF $\alpha$  агент частично отменяет воздействие LPS на параметры, характеризующие содержание разных фракций вДНК в крови животных. При этом TNF-связывающий белок, как и следовало ожидать, уменьшает количество вДНК в плазме (по сравнению со значениями этого параметра в группе мышей, которым вводили только LPS), и одновременно тормозит падение уровня связанной с клеточными мембранами вДНК, снижающееся при воздействии воспалительного агента (рис. 1Б, В).

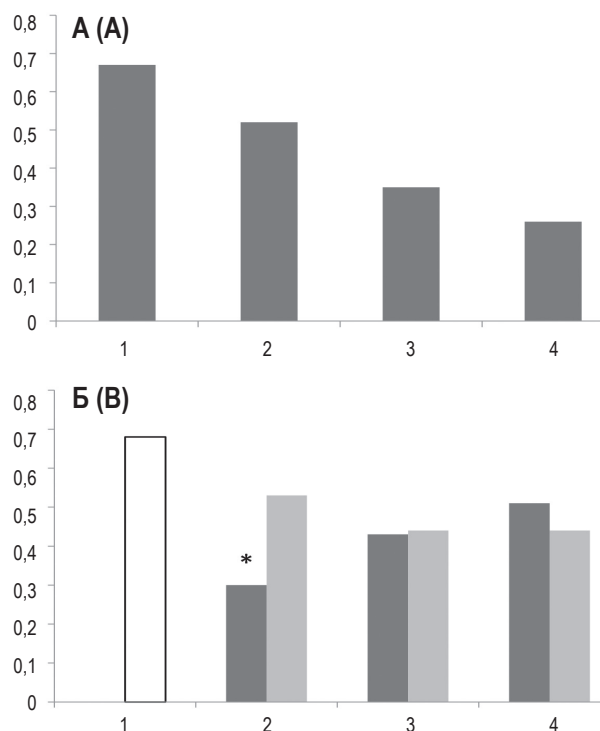
Учитывая данные, что значительная часть регистрируемой в плазме крови вДНК появляется в результате массового нетоза нейтрофилов, разумно предполагать, что и в наших экспериментах изменения фракций вДНК в ответ на LPS объясняются аналогичным образом. Поскольку хорошо известно, что TNF $\alpha$ , продуцируемый в организме в ответ на воспалительные стимулы, является одним из индукторов нетоза нейтрофилов [7], обнаруженные нами эффекты anti-TNF также свидетельствуют в пользу того, что наблюдаемые после введения LPS закономерные изменения фракций вДНК в основном определяются индукцией нетоза нейтрофилов этим воспалительным стимулом.

В то же время, как это видно на рисунке 3, введение anti-TNF существенно не влияет на реакцию лейкоцитов периферической крови в ответ на воспалительный агент. В группе мышей, которым был введен только LPS, изменения числа лейкоцитов происходят параллельно изменениям уровней вДНК в крови (ср. данные в соответствующие сроки после введения LPS на рисунках 1 и 3). При этом воспаление вызывает увеличение числа нейтрофилов и повышение уровня вДНК в плазме, в то время как число лимфоцитов (моноклеарных клеток) и уровень связанной с мембранами вДНК резко снижаются после введения LPS. В группе же мышей, которым вводили LPS + anti-TNF, такой параллелизм между изменениями исследуемых показателей существенно размывается, поскольку



**Рисунок 1.** Концентрация внеклеточной ДНК в крови мышей (C57Bl/6xDBA/2)F<sub>1</sub> в различные сроки после введения LPS и эффекты TNF-связывающего белка  
Примечание. По оси абсцисс – время после введения LPS, час. 1 – 0 ч, 2 – 8 ч, 3 – 11 ч, 4 – 24 ч. По оси ординат – уровень внеклеточной ДНК, нг/мл. А – внднк, циркулирующая в плазме (ccfDNA). Б – внднк, связанная с клеточной поверхностью (csbDNA). В – суммарная внднк (sumDNA). Белый столбец – контрольная группа, черные столбцы – опытная группа с введением LPS, серые столбцы – опытная группа с введением LPS и TNF-связывающего белка (anti-TNF). \* – достоверное отличие от контроля (p < 0,05).

Figure 1. Concentration of extracellular DNA in the blood of (C57Bl/6xDBA/2)F<sub>1</sub> mice at various times after LPS administration and the effects of TNF-binding protein  
Note. Abscissa, time after LPS administration, hour. 1, 0 h; 2, 8 h; 3, 11 h; 4, 24 h. The y-axis shows the level of extracellular DNA, ng/mL. (A) exDNA circulating in plasma (ccfDNA). (B) exDNA associated with the cell surface (csbDNA). (C) total cfDNA (sumDNA). White column, control group; black columns, experimental group with the introduction of LPS; gray columns, experimental groups with the introduction of LPS and TNF-binding protein (anti-TNF). \*, significant difference from control (p < 0.05).



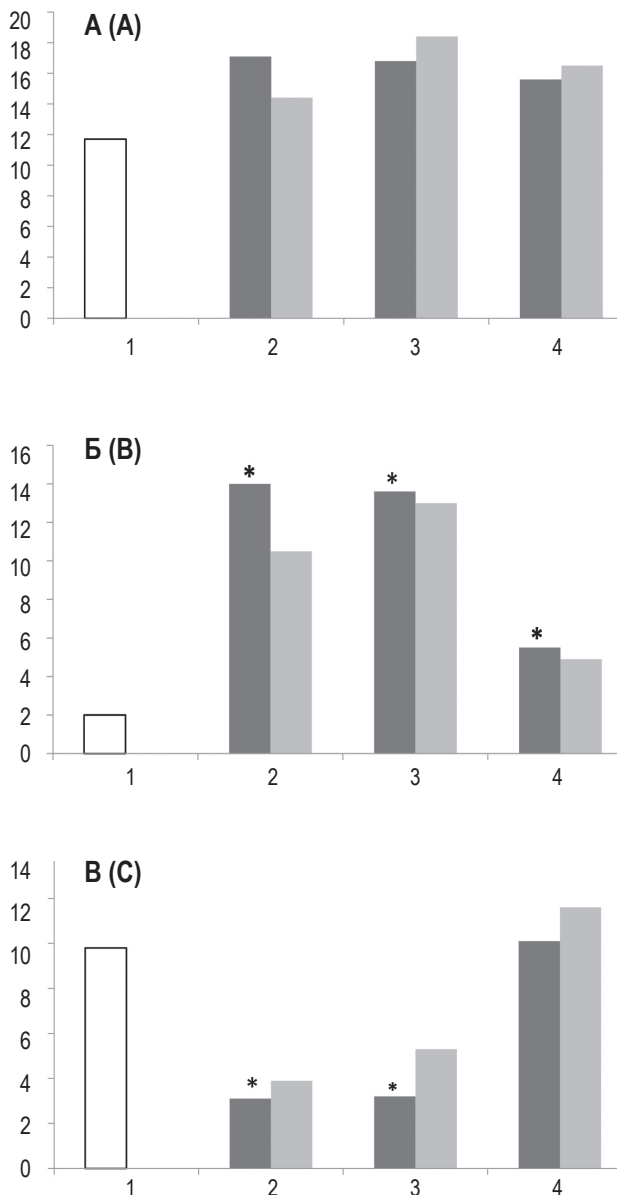
**Рисунок 2.** Динамика соотношения между внднк, связанной с мембранами клеток и суммарной внднк крови при развитии ответа на LPS

Примечание. По оси ординат – отношение внднк, связанной с поверхностью клеток к суммарной фракции внднк (csbDNA / sumDNA). По оси абсцисс: А – дозы ЛПС: 1 – 0, 2 – 10 нг, 3 – 1 мкг, 4 – 100 мкг. Б – время после введения ЛПС, час, 1 – 0 ч, 2 – 8 ч, 3 – 11 ч, 4 – 24 ч. Белый столбец – контрольная группа, черные столбцы – опытная группа с введением LPS, серые столбцы – опытная группа с введением LPS и TNF-связывающего белка (anti-TNF). \* – достоверное отличие от контроля (p < 0,05).

Figure 2. Dynamics of the ratio between cfDNA associated with cell membranes and total blood cfDNA during the development of response to LPS

Note. Along the y-axis, the ratio of cfDNA associated with the cell surface to the total fraction of cfDNA (csbDNA / sumDNA). Abscissa, (A) doses of LPS: 1, 0; 2, 10 ng; 3, 1 mcg; 4, 100 mcg. (B) time after the introduction of LPS, hour, 1, 0 h; 2, 8 h; 3, 11 h; 4, 24 h. White column, control group; black columns, experimental group with the introduction of LPS; gray columns, experimental group with the introduction of LPS and TNF-binding protein (anti-TNF). \*, significant difference from control (p < 0.05).

ку нейтрализующий TNF белок подавляет реакцию фракций внднк на развитие воспаления (предположительно снижая опосредуемую TNFα индукцию нетоза нейтрофилов), но не оказывает значимого влияния на вызванные введением LPS изменения лейкоцитов крови. Этот вывод о рассогласовании динамики разных показателей интенсивности воспаления на фоне введения anti-TNF подтверждается и сравнением корреляционных связей между исследуемыми параме-



**Рисунок 3. Влияние LPS на полиморфоядерные элементы периферической крови и эффекты TNF-связывающего белка**

Примечание. А – лейкоциты, Б – нейтрофилы, В – лимфоциты. Белый столбец – контрольная группа, черные столбцы – опытная группа с введением LPS, серые столбцы – опытная группа с введением LPS и TNF-связывающего белка (anti-TNF).

По оси ординат – количество клеток в 10<sup>3</sup>/л. По оси абсцисс – время после введения ЛПС, час. 1 – 0, 2 – 8 ч, 3 – 11 ч, 4 – 24 ч. \* – достоверное отличие от контроля (p < 0,05).

Figure 3. Effect of LPS on peripheral blood polymorphonuclear elements and effects of TNF-binding protein

Note. (A) leukocytes, (B) neutrophils, (C) lymphocytes. White column, control group; black columns, experimental group with the introduction of LPS; gray columns, experimental groups with the introduction of LPS and TNF-binding protein (anti-TNF). On the y-axis, the number of cells in 10<sup>3</sup>/L. Abscissa, time after LPS injection, hour. 1, 0 h; 2, 8 h; 3, 11 h; 4, 24 h. \*, significant difference from control (p < 0.05).

трами в группах мышей с введением только LPS и с одновременным введением LPS + anti-TNF. Обнаружено, что без «отключения» эффектов TNF $\alpha$  между значениями уровней мембраносвязанной внДНК и содержанием нейтрофилов в крови существует тесная отрицательная корреляция ( $\rho = -0,89$ ,  $p < 0,05$ ), которая заметно уменьшается на фоне введения anti-TNF ( $\rho = -0,47$ ,  $p < 0,05$ ). Таким образом, полученные в наших экспериментах результаты хорошо укладываются в господствующее сегодня представление о том, что наблюдаемые при остром воспалении изменения содержания внДНК в крови тесно связаны с активацией нетоза нейтрофилов, и, согласно нашим данным, одним из важных факторов, опосредующих индукцию нетоза в этих условиях, можно считать повышенную продукцию TNF $\alpha$ .

Обнаруженное нами расхождение между эффектами LPS на уровни внДНК крови и его же влиянием на гранулопоз в костном мозге и соответствующее ему повышение количества нейтрофилов в циркулирующей крови позволяет с большой степенью уверенности предполагать, что возрастающая после введения ЛПС продукция TNF $\alpha$  имеет своим следствием резко усиливающийся процесс нетоза, в то время как стимуляция гранулопоза и увеличенное поступление нейтрофилов в ткани определяются в этой ситуации неким иным фактором, прямо не связанным с продукцией TNF $\alpha$ . Имеющиеся на сегодня литературные данные дают возможность выдвинуть на роль гипотетического фактора, который может опосредовать стимулирующее влияние ЛПС на гранулоцитопоз, увеличенную продукцию IFN $\gamma$ . Показано [8], что в опытах *in vitro* непосредственное воздействие этого цитокина на макрофаги приводит к существенному ингибированию 27-холестеролгидроксилазы – цитохром-Р-450-зависимого фермента, превращающего холестерин в 27-гидроксихолестерин, который служит в клетке основным активирующим лигандом ядерных рецепторов LXR. Как сегодня известно, одним из эффектов активации LXR является торможение – через ингибирующее влияние на каскад цитокинов: IL-23  $\rightarrow$  IL-17  $\rightarrow$  GM-CSF – гранулоцитопоза в костном мозге (об этом механизме влияния LXR см. в фундаментальной статье Hong et al. [6]). Следовательно, можно ожидать, что после инъекции LPS выделяющийся в больших количествах IFN $\gamma$  должен снижать степень активации LXR и, соответственно, активировать цитокиновый каскад, стимулирующий, в конечном итоге, усиленную продукцию нейтрофилов. Такой патофизиологический механизм мог бы убедительно объяснить полученные нами результаты, в которых обнаружилась независимость регуляторных ме-

ханизмов, ответственных за стимуляцию притока нейтрофилов в ткани с одной стороны и за стимуляцию процесса нетоза в этих клетках, уже мигрировавших в ткани — с другой.

Наиболее интересным результатом вышеописанных опытов можно, по нашему мнению, считать тот факт, что активация нетоза нейтрофилов воспалительным агентом сопровождается разнонаправленным эффектом на количество внДНК в плазме и ее фракцию, прочно связанную с поверхностными белками цитоплазматической мембраны, а также то вытекающее отсюда обстоятельство, что доля мембраносвязанной фракции внДНК существенно снижается при воспалительной активации нетоза. Это наблюдение говорит, в частности, о том, что последний параметр может быть более чувствительным (и, вероятно, более устойчивым) показателем воспалительной активации нетоза нейтрофилов, и в этом качестве он может быть использован в клинической практике.

## Заключение

Обнаружившиеся в наших экспериментах увеличение внДНК плазмы с одновременным снижением мембраносвязанной внДНК наталкивает на предположение, что, по крайней мере, часть появляющейся в плазме внДНК является той «слущенной» с клеток внДНК, которая была прочно связана с поверхностными белками мембран до момента действия воспалительного стимула. Но в этом случае возрастание уровня внДНК плазмы, с одной стороны рассматриваемое как следствие массового нетоза, а с другой — понимаемое как переход части внДНК из одной фракции в другую, должно быть связано с нетозом

каким-то другим — до сих пор не принимаемым во внимание — образом. По нашему мнению, следует с новой точки зрения взглянуть на тот широко известный факт, что процесс нетоза характеризуется выходом во внеклеточное пространство не только нитей ДНК, но и огромного количества разнообразных протеаз, находившихся до того в специфических гранулах нейтрофилов. Вполне возможно, что эффект этих протеолитических ферментов, выделяющихся при стимуляции нетоза в тканях организма, в значительной степени аналогичен эффекту трипсина, добавляемому к клеткам крови *in vitro* в использованной нами методике определения внДНК. В таком случае, надо полагать, увеличение количества внДНК в плазме при активации нетоза обусловлено не только (а возможно, и не столько) выделяющейся экстрацеллюлярно ДНК нетозных клеток, но и освобождением и переходом в другую фракцию той ДНК, которая до того была прочно связана с мембранами клеток и потому не определялась как внДНК в плазме крови. Такой взгляд на сущность связи между увеличением уровня внДНК в плазме крови и реакцией нейтрофилов на воспалительные стимулы имеет право на существование и наилучшим образом согласуется с теми результатами, которые были получены в наших экспериментах. Эта гипотеза не менее обоснована имеющимися на сегодняшний день данными, чем предшествующее ей представление о роли нетоза в увеличении внДНК плазмы в ответ на воспалительные стимулы, и позволяет наметить новые пути экспериментального и клинического изучения внДНК, как потенциального параметра, способного характеризовать протекающие в организме патофизиологические процессы.

## Список литературы / References

1. Козлов В.А. Свободная внеклеточная ДНК в норме и при патологии // Медицинская иммунология, 2013. Т. 15, № 5. С. 399-412. [Kozlov V.A. Free extracellular DNA in normal state and under pathological conditions. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2013, Vol. 15, no. 5, pp. 399-412. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2013-5-399-412.
2. Колесникова О.П., Гойман Е.В., Демченко Е.Н., Гаврилова Е.Д., Козлов В.А. Ранние маркеры фенотипической гетерогенности системной красной волчанки в экспериментальной модели // Бюллетень сибирской медицины, 2017. Т. 16, № 4. С. 155-164. [Kolesnikova O.P., Goiman E.V., Gavrilova E.D., Demchenko E.N., Kozlov V.A. Early markers of phenotypic heterogeneity in the induced model of systemic lupus erythematosus. *Bulleten sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2017, Vol. 16, no. 4, pp. 155-164. (In Russ.)]
3. Судаков Н.П., Попкова Т.П., Новикова М.А., Катышев А.И., Никифоров С.Б., Пушкарев Б.Г., Гольдберг О.А., Клименков И.В., Лепехова С.А., Апарцин К.А., Ежикеева С.Д., Тен М.Н., Константинов Ю.М. Взаимосвязь уровня свободно циркулирующей митохондриальной ДНК крови с активностью маркеров цитолиза при экспериментальной острой мелкоочаговой ишемии миокарда // Сибирский медицинский журнал, 2013. № 5. С. 83-85. [Sudakov N.P., Popkova T.P., Novikova M.A., Katyshev A.I., Nikiforov S.B., Pushkarev B.G., Goldberg O.A., Klimentov I.V., Lepekhova S.A., Apartsin K.A., Ezhikeeva S.D., Ten M.N., Konstantinov Yu.M. Interrelation between the level of free circulating mtDNA of blood with the activity of cytolysis markers in the experimental acute small-focal myocardial ischemia. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal = Siberian Medical Journal*, 2013, no. 5, pp. 83-85. (In Russ.)]
4. Цырендоржиев Д.Д., Орловская И.А., Сенников С.В., Трегубчак Т.В., Гилева И.П., Цырендоржиева М.Д., Щелкунов С.Н. Биологические эффекты индивидуально синтезированного TNF-связывающего

домена белка CrmB вируса натуральной оспы // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2014. Т. 157, № 2. С. 214-217. [Tsyrendorzhiiev D.D., Orlovskaya I.A., Sennikov S.V., Tsyrendorzhiieva M.D., Tregubchak T.V., Gileva I.P., Shchelkunov S.N. Biological effects of individually synthesized TNF-binding domain of variola virus CrmB protein. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2014, Vol. 157, no. 2, pp. 249-252. (In Russ.)]

5. Bryzgunova N.V., Tamkovich S.N., Cherepanova A.V., Yarmoshchuk S.V., Permyakova V.I., Anykeeva O.Y., Laktionov P.P. Redistribution of free- and cell-surface-bound DNA in blood of benign and malignant prostate tumor patients. *Acta Naturae*, 2015, Vol. 7, no. 2, pp. 115-118.

6. Hong C., Kidani Y., A-Gonzalez N., Phung T., Ito A., Rong X., Ericson K., Mikkola H., Beaven S.W., Miller L.S., Shao W.-H., Cohen P.L., Castrillo A., Tontonoz P., Bensing S.J. Coordinate regulation of neutrophil homeostasis by liver X receptors in mice. *J. Clin. Invest.*, 2012, Vol. 122, no. 1, pp. 337-347.

7. Joshi M.B., Lad A., Bharath Prasad A.S., Balakrishnan A., Ramachandra L., Satyamoorthy K. High glucose modulates IL-6 mediated immune homeostasis through impeding neutrophil extracellular trap formation. *FEBS Lett.*, 2013, Vol. 587, no. 14, pp. 2241-2246.

8. Reiss A.B., Awadallah N.W., Malhotra S., Montesinos M.C., Chan E.S.L., Javitt N.B., Cronstein B.N. Immune complexes and IFN $\gamma$  decrease cholesterol 27-hydroxylase in human arterial endothelium and macrophages. *J. Lipid Res.*, 2001, Vol. 42, no. 11, pp. 1913-1922.

9. Sollberger G., Tilley D.O., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: The biology of chromatin externalization. *Dev. Cell*, 2018, Vol. 44, no. 5, pp. 542-553.

10. Tamkovich S.N., Litviakov N.V., Bryzgunova O.E., Dobrodeev A.Y., Rykova E.Y., Tuzikov S.A., Zav'ialov A.A., Vlassov V.V., Cherdyntseva N.V., Laktionov P.P. Cell-surface-bound circulating DNA as a prognostic factor in lung cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2008, Vol. 1137, no. 1, pp. 214-217.

11. van der Meer A.J., Kroeze A., Hoogendijk A.J., Soussan A.A., van der Schoot C.E., Wuillemin W.A., Voermans C., van der Poll T., Zeerleder S. Systemic inflammation induces release of cell-free DNA from hematopoietic and parenchymal cells in mice and humans. *Blood Adv.*, 2019, Vol. 3, no. 5, pp. 724-728.

---

**Авторы:**

**Демченко Е.Н.** — к.х.н., научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Гаврилова Е.Д.** — к.б.н., заведующая лабораторией экспериментальной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Гойман Е.В.** — к.м.н., научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Вольский Н.Н.** — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Колесникова О.П.** — д.м.н., главный научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Козлов В.А.** — д.м.н., профессор, академик РАН, научный руководитель ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Authors:**

**Demchenko E.N.**, PhD (Chemistry), Research Associate, Laboratory of Experimental Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Gavrilova E.D.**, PhD (Biology), Head, Laboratory of Experimental Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Goiman E.V.**, PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Experimental Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Volsky N.N.**, PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Experimental Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Kolesnikova O.P.**, PhD, MD (Medicine), Chief Research Associate, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Kozlov V.A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Scientific Director, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation