

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-002-008.953-092

Салмаси Ж.М., Казимирский А.Н., Порядин Г.В., Панина М.И., Ларина В.Н., Рыжих А.А., Стоделова Е.А.

Постковидный синдром сопровождается формированием нейтрофильных экстраклеточных ловушек в нитевидной форме

ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117997, Москва, Россия, ул. Островитянова, д. 1

Цель исследования – определение числа нейтрофильных экстраклеточных ловушек и уровня внеклеточных пуриновых азотистых оснований в периферической крови больных с постковидным синдромом.

Методика. Обследован 41 амбулаторный пациент в возрасте от 18 до 59 лет (21 после перенесенной коронавирусной инфекции, 20 лиц, не перенесших инфекцию, составили группу сравнения). Для визуализации и подсчета НЭЛ использовали метод флуоресцентной микроскопии. Выявление нейтрофильных экстраклеточных ловушек (НЭЛ) проводили с помощью флуоресцентного красителя для двухцепочечной ДНК SYBR Green I (Evrogen). Пуриновые азотистые основания определяли методом цветной реакции, основанной на взаимодействии их с азотнокислым серебром с образованием окрашенного соединения.

Результаты. НЭЛ нитевидной формы в крови у пациентов с постковидным синдромом наблюдались на протяжении 3 и более месяцев. Концентрация внеклеточных пуриновых азотистых оснований в крови больных возросла пропорционально тяжести перенесенного заболевания.

Заключение. Постковидный синдром сопровождается формированием в крови больных нейтрофильных экстраклеточных ловушек в нитевидной форме. В периферической крови больных с посткоронавирусным синдромом выявляются внеклеточные пуриновые азотистые основания в концентрациях, способных вызвать вторичную альтерацию клеток.

Ключевые слова: постковидный синдром; нейтрофильные экстраклеточные ловушки; внеклеточные пуриновые азотистые основания; ковид-19; патогенез

Для цитирования: Салмаси Ж.М., Казимирский А.Н., Порядин Г.В., Панина М.И., Ларина В.Н., Рыжих А.А., Стоделова Е.А. Постковидный синдром сопровождается формированием нейтрофильных экстраклеточных ловушек в нитевидной форме. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(3): 137-140.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.03.137-140

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Порядин Г.В., Ларина В.Н.; сбор и обработка материала – Рыжих А.А., Стоделова Е.А.; подготовка иллюстративного материала – Казимирский А.Н.; статистическая обработка материала – Панина М.И.; написание – Казимирский А.Н.; редактирование – Салмаси Ж.М. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Казимирский Александр Николаевич, e-mail: alnica10@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 31.03.2022

Принята к печати 14.06.2022

Опубликована 12.09.2022

Salmasi J.M., Kazimirskii A.N., Poryadin G.V., Panina M.I., Larina V.N., Ryzhikh A.A., Stodelova E.A.

Post-covid syndrome is associated with the formation of neutrophil extracellular traps in a filamentous form

Pirogov Russian National Research Medical University,
Ostrovityanova St. 1, Moscow 117997

Aim. The aim of the study was to determine the number of neutrophil extracellular traps (NETs) and the concentration of extracellular purine nitrogenous bases in the peripheral blood of patients with post-COVID syndrome.

Methods. 41 outpatient patients aged 18 to 59 years were examined (21 after coronavirus infection and 20 without previous infection, the comparison group). Fluorescence microscopy was used to visualize and count NETs. NETs were detected using a fluores-

cent dye for double-stranded DNA, SYBR Green I (Evrogen). Purine nitrogenous bases were determined by a color reaction based on their interaction with silver nitrate to form a colored compound.

Results. The filamentous NETs in the blood of patients with post-COVID syndrome were present for 3 months or longer. The concentration of extracellular purine nitrogenous bases in the patients' blood increased proportionally to the disease severity.

Conclusion. Post-COVID syndrome is accompanied by the formation of filamentous NETs in the blood of patients. Extracellular purine nitrogenous bases are found in the peripheral blood of patients with post-COVID syndrome at concentrations that are capable of causing secondary alterations of cell.

Keywords: post-COVID syndrome; neutrophil extracellular traps; extracellular purine nitrogenous bases; COVID-19; pathogenesis

For citation: Salmasi J.M., Kazimirskii A.N., Poryadin G.V., Panina M.I., Larina V.N., Ryzhikh A.A., Stodelova E.A. Postcovid syndrome is associated by the formation of neutrophils extracellular traps in a filamentous form. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(3): 137-140. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2022.03.137-140

Author's contribution: the concept and design of the study – Poryadin G.V., Larina V.N.; collection and processing of material – Ryzhikh A.A., Stodelova E.A.; preparation of illustrative material – Kazimirskii A.N.; statistical processing of the material – Panina M.I.; editing – Salmasi J.M. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: Alexander N. Kazimirskii, Doctor of Biol. Sciences, Associate Prof., Leading Researcher, Department of Molecular Technologies, Pirogov Russian National Research Medical University; 1, Ostrovityanov St., Moscow, 117997, Russian Federation, alnica10@mail.ru

Financing. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Information about the authors:

Salmasi J.M., <https://orcid.org/0000-0001-8524-0019>

Kazimirskii A.N., <https://orcid.org/0000-0002-3079-4089>

Poryadin G.V., <https://orcid.org/0000-0003-2010-3296>

Panina M.I., <https://orcid.org/0000-0002-7651-0037>

Larina V.N., <https://orcid.org/0000-0001-7825-5597>

Ryzhikh A.A., <https://orcid.org/0000-0002-0673-5775>

Stodelova E.A., <https://orcid.org/0000-0002-0673-5775>

Received 31.03.2022

Accepted 14.06.2022

Published 12.09.2022

Постковидный синдром – патологическое состояние, которое регистрируется у 20% людей, перенесших коронавирусную инфекцию (COVID-19). Больные с постковидным синдромом страдают от головных болей, астении, артралгий, последствий поражения внутренних органов (легких, сердца, ЖКТ), кожи и нейропсихопатологических расстройств. У больных развивается «постковидное воспаление» различной локализации, которое, как можно предположить, индуцировано формированием в крови нейтрофильных экстраклеточных ловушек (НЭЛ) [1]. Поражение внутренних органов может быть обусловлено токсическим действием продуктов ферментативной деградации волокон с ДНК, возникающих при распаде НЭЛ.

Цель исследования – определение количества нейтрофильных экстраклеточных ловушек, внеклеточных пуриновых азотистых оснований в периферической крови больных с постковидным синдромом.

Методика

Пациенты. Проведение работ осуществлялись в соответствии с приказом Минздрава России

№ 199 от 1 апреля 2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и в соответствии с регламентом декларации ЕС от 2010 г. об использовании лабораторных животных. Исследование одобрено Этическим комитетом РНИМУ им. Н.И. Пирогова, протокол № 203. В исследование были включены 21 амбулаторный пациент в возрасте от 18 до 59 лет после перенесенной коронавирусной инфекции. Группу сравнения (здоровые доноры) составили 20 лиц в возрасте от 18 до 59 лет без перенесенной коронавирусной инфекции, обратившиеся к врачу-терапевту поликлиники для прохождения диспансеризации.

Определение содержания нейтрофильных экстраклеточных ловушек

Получение клеточных фракций. В исследовании использовали клеточные фракции нейтрофилов. Стерильно выделенные нейтрофилы переносили в среду RPMI-1640 и использовали в экспериментах по культивированию. Жизнеспособность выделенных нейтрофилов составляла не менее 90%, которую определяли в тесте с 0,1% раствором трипанового синего.

Флуоресцентное окрашивание нейтрофильных экстраклеточных ловушек. Для выявления и подсчета нейтрофильных экстраклеточных ловушек использовали флуоресцентную микроскопию. НЭЛ окрашивали флуоресцентным красителем SYBR Green (Evrogen). Среди 100 нейтрофилов подсчитывали количество нейтрофильных экстраклеточных ловушек. Результаты выражали в процентах — как отношение числа нейтрофильных экстраклеточных ловушек к общему количеству нейтрофилов.

Определение пуриновых азотистых оснований. Метод основан на цветной реакции взаимодействия пуриновых азотистых оснований с азотнокислым серебром с образованием окрашенного соединения. Пуриновые азотистые основания из плазмы крови экстрагировали хлороформом, растворяли в 10% NaOH и добавляли 500 мкл 1% раствора AgNO_3 , приготовленного на 10% растворе аммиака. Пробы фотометрировали при длине волны 610 нм. Калибровочный график был линейен в диапазоне 0–10 мг/мл.

Статистическая обработка. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакетов программ STATISTICA 12.0 (StatSoft). Описательная статистика представлена при нормальном распределении в виде среднего значения (M) \pm стандартная ошибка (m). При распределении, отличающемся от нормального, — в виде медианы (Me) и 25-го и 75-го перцентилей распределения значений показателя (межквартильный размах). Сравнение количественных признаков проводили по данным дисперсионного анализа Краскела–Уоллеса. Различия считали статистически значимыми при значениях $p < 0,05$.

Результаты

Исследование нейтрофильных экстраклеточных ловушек (НЭЛ) у больных с постковидным синдромом показывает, что они формируются в виде тонких одиночных нитей значительной длины. Размеры нитей с ДНК превышают несколько десятков клеточных диаметров. Особенность нейтрофильных экстраклеточных ловушек у больных с постковидным синдромом состоит в том, что сетевидную структуру эти волокна ДНК не формируют и к захвату с последующей ретракцией апоптозирующих клеток не способны.

Ранее была выявлена зависимость морфологической структуры НЭЛ от вида воспаления [2]. Формирование нейтрофильных экстраклеточных ловушек в виде одиночных нитей НК, по нашим данным, свидетельствует о развитии асептического воспалительного процесса у этих больных. Количество НЭЛ у больных с постковидным синдромом невелико, но наблюдается

на протяжении весьма длительного промежутка времени (3 месяца и более). У больных с легким течением заболевания количество НЭЛ составляет $0,00[0,00 \div 1,31]$ %, в группе со среднетяжелым течением заболевания — $0,00[0,00 \div 0,56]$ %, а при тяжелой форме ковида НЭЛ не определяются.

Концентрация внеклеточных пуриновых азотистых оснований в плазме крови больных была увеличена пропорционально тяжести заболевания. В группе больных с легким течением ковида концентрация внеклеточных пуриновых азотистых оснований составляет $7,38[0,0 \div 60,7]$ мг/мл, при среднетяжелой и тяжелой форме течения заболевания — $19,15[0,0 \div 33,5]$ и $34,19[3,35 \div 70,0]$ мг/мл, соответственно.

Формирование НЭЛ в нитевидной форме представляет определенную опасность в связи с тем, что такие морфологические структуры могут быть источниками внеклеточных пуриновых азотистых оснований. За счет собственных ДНКаз, локализованных на самом хроматине, которые активируются при уменьшении степени спирализации, развивается деградация нитей ДНК, и свободные нуклеотиды появляются во внеклеточном пространстве. Эктоферменты CD39 и CD73, локализованные на поверхностной мембране клеток крови и эндотелия, катализируют гидролиз нуклеотидов до азотистых оснований и могут вызывать увеличение концентрации внеклеточных пуриновых азотистых оснований. Исследования сыворотки крови пациентов с COVID-19 показали повышенные уровни внеклеточной ДНК, а также специфические маркеры НЭЛ [3]. Получены данные о том, что на клетках крови больных увеличена активность ферментов, катализирующих гидролиз внеклеточных нуклеотидов до свободных азотистых оснований [4]. НЭЛ продуцируют внеклеточные азотистые основания, которые могут играть важную роль в патогенезе повреждения в постковидном периоде.

Обсуждение

Молекулярные индукторы запуска формирования НЭЛ в настоящее время неизвестны. В настоящем исследовании мы выявляли НЭЛ у больных с постковидным синдромом только в нитевидной форме. Никаких иных морфологических вариантов НЭЛ у обследуемых больных обнаружено не было. Причем, у больных с тяжелым течением НЭЛ отсутствуют. При этом концентрация внеклеточных пуриновых азотистых оснований в плазме крови больных с постковидным синдромом была увеличена пропорционально степени тяжести заболевания. У больных с тяжелой формой постковидного синдрома НЭЛ отсутствуют, но мы предполагаем, что нитевидные структуры ДНК продуцируют иные

клетки крови. В настоящее время мы находим подтверждение этого положения в наших текущих исследованиях. Поэтому увеличение концентрации внеклеточных пуриновых азотистых оснований пропорционально повышению тяжести постковидного синдрома представляется закономерным.

Внеклеточные пуриновые азотистые основания токсичны для организма, однако механизм их повреждающего действия неизвестен. Экспериментальные модели на животных с продолжительным адениновым питанием показали, что происходит быстрое развитие патологии почек с обширным тубулоинтерстициальным фиброзом, атрофией канальцев, образованием кристаллов и выраженной кальцификацией сосудов, а также сердечно-сосудистые нарушения [5–8].

Литература

(п.п. 3–8 см. References)

1. Кулес И.В., Салмаси Ж.М., Терновой К.С., Казимирский А.Н., Ободзинская Т.Е., Лим В.Г., и др. Предпосылки к созданию атласа постковидного воспаления как способа персонализированной фармакотерапии, а также прогнозирования и предупреждения органых и системных дисфункций. *Медицинский Совет*. 2021; (12): 72–88. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2021-12-72-88>
2. Казимирский А.Н., Салмаси Ж.М., Порядин Г.В., Панина М.И. Новые возможности диагностики и исследования патогенеза различных видов воспаления. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2022; 66(2): 34–42. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2022.02.34-42>

References

1. Kukes I.V., Salmasi J.M., Ternovoy K.S., Kazimirskii A.N., Obodzinская Т.Е., Lim V.G., et al. Prerequisites for the creation of an atlas

of postcovid inflammation as a way of personalized pharmacotherapy, as well as predicting and preventing organ and systemic dysfunctions. *Meditsinskiy sovet*. 2021; (12): 72–88. (In Russian). <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2021-12-72-88>

2. Kazimirskii A.N., Salmasi J.M., Poryadin G.V., Panina M.I. New opportunities for diagnosis and investigation of the pathogenesis of various types of inflammation. *Patologicheskaya Fiziolgiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2022; 66(2): 34–42. (in Russian). <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2022.02.34-42>
3. Zuo Y., Yalavarthi S., Shi H., Gockman K., Zuo M., Madison J.A., et al. Neutrophil extracellular traps in COVID-19. *JCI Insight*. 2020 Jun 4; 5(11):e138999. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.138999>
4. Ahmadi P., Hartjen P., Kohsar M., Kummer S., Schmiedel S., Bockmann J.H., et al. Defining the CD39/CD73 Axis in SARS-CoV-2 Infection: The CD73- Phenotype Identifies Polyfunctional Cytotoxic Lymphocytes. *Cells*. 2020 Jul 22; 9(8): 1750. <https://doi.org/10.3390/cells9081750>
5. Molnar J.J., Riede U.N., Widmer A., Rohr H.P. Adenin-induzierte Leberparenchymzellschädigung [Adenine induced liver parenchymal cell injury]. *Verh Dtsch Ges Pathol*. 1970; 54: 524–30. (in German). PMID: 4104599.
6. Riede U.N., Widmer A.E., Bianchi L., Molnar J., Rohr H.P. Ultrastrukturell-morphometrische Untersuchungen an der Rattenleberparenchymzelle nach akuter Adeninintoxikation [Ultrastructural-morphometric study on rat liver parenchymal cells in acute adenine poisoning]. *Pathol Eur*. 1971; 6(1): 1–18. (in German). PMID: 4323827.
7. Diwan V., Brown L., Gobe G.C. Adenine-induced chronic kidney disease in rats. *Nephrology (Carlton)*. 2018 Jan; 23(1): 5–11. <https://doi.org/10.1111/nep.13180>. PMID: 29030945.
8. Dos Santos I.F., Sheriff S., Amlal S., Ahmed R.P.H., Thakkar C.V., Amlal H. Adenine acts in the kidney as a signaling factor and causes salt- and water-losing nephropathy: early mechanism of adenine-induced renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2019 Apr 1; 316(4):F743–F757. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00142.2018>. Epub 2019 Jan 9. PMID: 30623725; PMCID: PMC6483032.

Сведения об авторах:

Салмаси Ж.М., доктор мед. наук, проф., зав. каф. патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета, e-mail: profjms@yandex.ru

Казимирский А.Н., доктор биол. наук, вед. науч. сотр. отдела молекулярных технологий, e-mail: alnica10@mail.ru;

Порядин Г.В., член-корр. РАН, доктор мед. наук, проф. каф. патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета, e-mail: poryadin_GV@rsmu.ru;

Панина М.И., доктор мед. наук, проф. каф. патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета, e-mail: pan-mar@list.ru;

Ларина В.Н., доктор мед. наук, проф., зав. каф. поликлинической терапии лечебного факультета, e-mail: larinav@mail.ru;

Рыжих А.А., аспирант каф. поликлинической терапии лечебного факультета, e-mail: lina.alinamedic@yandex.ru

Стоделова Е.А., аспирант каф. поликлинической терапии лечебного факультета, e-mail: korableva_ea@rsmu.ru