

DOI: <https://doi.org/10.17816/Ci627519>

Уровень внеклеточной ДНК как показатель активности воспалительных реакций у пациентов с ревматоидным артритом и бронхиальной астмой

Н.Н. Вольский, Е.Н. Демченко, Е.В. Гойман, В.А. Козлов, Е.Д. Гаврилова

Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Выполнено клиничко-лабораторное обследование пациентов с ревматоидным артритом и бронхиальной астмой. Выбор нозологий был сделан для изучения изменений внеклеточной ДНК в крови при иммунопатологических процессах, исходя из общепринятых взглядов о роли хелперного баланса в патогенезе данных заболеваний. Степень активности заболевания при ревматоидном артрите зависит от уровня воспалительных изменений в суставах и, таким образом, тесно связана со сдвигом баланса хелперов в Th1-сторону, патогенез же бронхиальной астмы в основном определяется контролируемой активированными Th2-лимфоцитами продукцией специфических антител.

Цель исследования — изучение изменений внеклеточной ДНК в крови пациентов при иммунопатологических процессах в зависимости от соотношения Th1-/Th2-баланса и сопоставление этих данных с параметрами стандартных лабораторных анализов и показателями, характеризующими состояние нейтрофильных гранулоцитов и их способность к нетозу.

Методы. Концентрацию внеклеточной ДНК определяли с использованием флюоресцентного реагента Quant-IT™ PicoGreen для двуцепочечной ДНК. Выделенные в двойном градиенте плотности фиколл-урографин нейтрофилы культивировали с добавлением или без фторбол-миристат-ацетата с последующим внесением Sytox Green.

Результаты. Показано, что существенным различием между изучаемыми иммунопатологическими состояниями является значительное снижение уровня внеклеточной ДНК в плазме крови у пациентов с астмой, что резко контрастирует с его повышением при артрите. Лабораторные показатели подтверждают наличие локального воспаления у пациентов с бронхиальной астмой при отсутствии явных симптомов системной воспалительной реакции, в то время как у пациентов с ревматоидным артритом воспалительные изменения в суставах сопровождаются повышением уровня С-реактивного белка, указывающим на системную реакцию организма в ответ на воспалительные стимулы.

Выводы. Таким образом, можно предположить, что состояние Th1-/Th2-баланса представляет собой один из значимых регуляторов, определяющих концентрацию внеклеточной ДНК в крови. Сдвиг данного соотношения в сторону преобладания Th1-клеток должен, согласно предлагаемой гипотезе, способствовать развитию воспалительных процессов в организме и увеличивать количество внеклеточной ДНК, в то время как сдвиг баланса хелперов в сторону доминирования Th2-лимфоцитов должен подавлять эти процессы и приводить к снижению внеклеточной ДНК в крови.

Ключевые слова: внеклеточная ДНК; воспаление; ревматоидный артрит; бронхиальная астма; нейтрофильные лейкоциты; нетоз; миелопероксидаза; провоспалительные цитокины.

Как цитировать:

Вольский Н.Н., Демченко Е.Н., Гойман Е.В., Козлов В.А., Гаврилова Е.Д. Уровень внеклеточной ДНК как показатель активности воспалительных реакций у пациентов с ревматоидным артритом и бронхиальной астмой // Цитокины и воспаление. 2023. Т. 20, № 2. С. 31–39. DOI: <https://doi.org/10.17816/Ci627519>

DOI: <https://doi.org/10.17816/CI627519>

Extracellular DNA level as an indicator of the activity of inflammatory reactions in patients with rheumatoid arthritis and asthma

Nikolay N. Volskiy, Elena N. Demchenko, Elena V. Goiman, Vladimir A. Kozlov, Elena D. Gavrilova

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: We performed a clinical and laboratory examination of patients with rheumatoid arthritis and bronchial asthma. Nosologies were selected to examine extracellular DNA changes in the blood during immunopathological processes based on generally accepted views on the role of helper balance in disease pathogenesis. The degree of disease activity in rheumatoid arthritis primarily depends on the severity of inflammatory changes in the joints; therefore, it is closely associated with a shift in the balance of helpers toward the Th1. According to today's concepts, the pathogenesis of asthma is determined by the intensive production of specific antibodies, which are controlled by activated Th2 lymphocytes.

AIM: To study extracellular DNA changes in the blood of patients during immunopathological processes depending on the Th1/Th2 balance ratio and compare these data with the parameters of standard laboratory tests and indicators of neutrophil activities and their ability to netosis.

METHODS: Extracellular DNA concentration was determined using the Quant-IT™ PicoGreen fluorescent reagent for double-stranded DNA. Neutrophils isolated in a double-density gradient of ficoll–urografin were cultured with or without the addition of phorbol myristate acetate followed by Sytox Green.

RESULTS: The studied immunopathological conditions had significantly decreased extracellular DNA levels in the plasma of patients with asthma, which sharply contrasted with its increase in patients with arthritis. Laboratory parameters confirmed the presence of local inflammation in patients with asthma without obvious symptoms of a systemic inflammatory response, while in patients with arthritis, inflammatory changes in the joints were accompanied by an increased C-reactive protein level, indicating a systemic reaction of the body in response to inflammatory stimuli.

CONCLUSIONS: Thus, the state of the Th1/Th2 balance is assumed as one of the significant regulators that determined the extracellular DNA concentration in the blood. According to the proposed hypothesis, the shift in this ratio toward the predominance of Th1 cells should promote the development of inflammatory processes in the body and increase the amount of extracellular DNA, while a shift in the balance of helpers toward the dominance of Th2 lymphocytes should suppress these processes and consequently decrease the extracellular DNA in the blood.

Keywords: extracellular DNA; inflammation; rheumatoid arthritis; asthma; neutrophilic leukocytes; netosis; myeloperoxidase; proinflammatory cytokines.

To cite this article:

Volskiy NN, Demchenko EN, Goiman EV, Kozlov VA, Gavrilova ED. Extracellular DNA level as an indicator of the activity of inflammatory reactions in patients with rheumatoid arthritis and asthma. *Cytokines and Inflammation*. 2023;20(2):31–39. DOI: <https://doi.org/10.17816/CI627519>

ОБОСНОВАНИЕ

Результаты многочисленных клинических и экспериментальных исследований, предпринятых за последние двадцать лет, позволяют с большой степенью уверенности говорить о том, что одним из важных факторов, обуславливающих существенное повышение содержания внеклеточной ДНК (внДНК) в плазме крови больных с различной патологией, являются воспалительные реакции, играющие значимую роль в патогенезе рассматриваемых заболеваний. Связь уровня внДНК с развитием воспалительных процессов была обнаружена при сепсисе, системной красной волчанке, ревматоидном артрите (РА), инфаркте миокарда, а также в экспериментах при заражении подопытных животных инфекционными агентами [1–4]. В нашем исследовании, выполненном на мышах линий C57Bl/6 и DBA/2, также было показано, что введение животным провоспалительного агента — липополисахарида (ЛПС) уже в первые часы после воздействия приводит к существенному увеличению количества внДНК в плазме крови, причём прирост этого показателя непосредственно зависит от дозы вводимого препарата [5]. Таким образом, на сегодняшний день нет оснований для сомнений в том, что системная реакция воспаления может быть причиной повышенного содержания внДНК в крови и что во многих ситуациях измерение этого параметра способно служить одним из информативных показателей интенсивности протекающих в организме воспалительных реакций.

Конкретные патофизиологические механизмы, обуславливающие возрастание количества внДНК (и, соответственно, её уровня в крови), ещё мало изучены и обычно связываются с увеличенной гибелью клеток (путём некроза или апоптоза) при тех или иных заболеваниях. В то же время широкое распространение [6] получило представление о том, что существенным источником внДНК при воспалительных реакциях служит активация нейтрофильных лейкоцитов, приводящая к их нетозу — процессу выхода во внеклеточное пространство нитей ДНК, которые образуют сетевидные структуры, способствующие локализации и нейтрализации инфекции в очагах воспаления и скопления нейтрофилов. В ряде клинических и экспериментальных работ было показано, что активация нейтрофильного звена неспецифического иммунитета и усиление процесса нетоза сопровождаются параллельным увеличением уровня внДНК в крови и других жидкостях тела у человека и животных [7].

Кроме того, следует иметь в виду, что развитие воспалительных реакций и их интенсивность находятся под контролем иммунной системы, поэтому сдвиг баланса хелперов в сторону Th1-лимфоцитов, продуцирующих провоспалительные цитокины, является постоянным элементом реакций организма на индуцирующие воспаление внешние воздействия и его выраженность во многом определяет патогенез воспалительных процессов при различных заболеваниях. Исходя из такого

общепринятого взгляда на регуляцию воспалительных реакций, естественно ожидать, что во многих случаях изменения уровня внДНК в крови могут быть значимо связаны с величиной Th1-/Th2-соотношения в организме и до определённой степени отражать различия в балансе хелперов при развитии различных патологических процессов. В ранее выполненной нами экспериментальной работе [8] было обнаружено, что динамика содержания внДНК в плазме крови индивидуальных подопытных мышей в ответ на введение малых доз ЛПС статистически связана с развитием у этих животных одного из противоположных вариантов хронической реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ), что определяется исходным преобладанием Th1- или Th2-зависимых иммунных реакций в период индукции РТПХ. Эти данные можно рассматривать как косвенное свидетельство в пользу наличия патогенетической связи между состоянием Th1-/Th2-баланса в организме и изменениями уровней внДНК в крови при некоторых патофизиологических процессах, но, разумеется, этот вопрос ещё требует тщательного изучения.

На основе вышеизложенных представлений нами было запланировано и выполнено клинико-лабораторное обследование пациентов с РА и бронхиальной астмой (БА), проходивших курс терапии в ревматологическом и аллергологическом отделениях клиники иммунопатологии Научно-исследовательского института фундаментальной и клинической иммунологии (НИИФКИ) г. Новосибирска. Основные результаты проведённого обследования пациентов с РА и БА были опубликованы ранее в двух отдельных сообщениях [9, 10].

Цель исследования — анализ полученных данных и сопоставление изменений уровней внДНК при патологических состояниях, тесно связанных со сдвигами баланса хелперов в сторону Th1- или Th2-клеток, а также зависимостей, существующих в этих условиях, между внДНК и другими показателями интенсивности воспалительных реакций, включая степень активации нейтрофильных лейкоцитов, как звена неспецифического иммунитета.

МЕТОДЫ

Выделение внДНК. Забор периферической крови для проведения анализа осуществлялся с помощью венной пункции в вакуумную пробирку с антикоагулянтом (ЭДТА).

Плазму отделяли от форменных элементов центрифугированием при 400g в течение 20 мин [11]. Выделение внДНК из плазмы проводили на колонках компании «БиоСилика» (Новосибирск) согласно инструкции по применению «Набора для выделения ДНК из плазмы крови». 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.

Определение ДНК проводили с помощью флуоресцентного красителя PicoGreen (Invitrogen, США). Концентрация ДНК пересчитывалась по калибровочной кривой, построенной для известных концентраций стандартной двухцепочечной λ -ДНК.

Выделение нейтрофилов. Периферическую кровь у доноров и пациентов с РА забирали в утренние часы натощак в пропиленовые пробирки с гепарином (20 МЕ/мл крови). Нейтрофилы выделяли с помощью центрифугирования в двойном градиенте плотности фиколл-урографин ($\rho=1,077$ г/см³ и $\rho=1,119$ г/см³) при 400g в течение 25 мин. Полученное кольцо нейтрофилов переносили в пробирки и трижды отмывали в 5 мл PBS (Phosphate-buffered saline), центрифугируя при 200g в течение 10 минут, а затем ресуспендировали в культуральной среде, включающей RPMI-1640 без фенолового красного с добавлением 1% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки. Нейтрофильные лейкоциты составляли более 98% во фракции выделенных клеток, а их жизнеспособность — 99%, что определялось тестом с трипановым синим.

Определение спонтанного и стимулированного некроза нейтрофилов *in vitro*. Свежевыделенные нейтрофилы переносили в чёрный планшет в концентрации 2×10^5 клеток на лунку и часть из них стимулировали добавлением форбол-миристан-ацетата (Sigma Aldrich, Франция) до концентрации 50 nM, с последующим культивированием при 37 °C в атмосфере 5% CO₂ в течение 3 ч. Затем в лунки вносили 5 μ M Sytox Green (Invitrogen, США). Уровень флуоресценции регистрировали на ридере TristarTM LB941 BERTHOLD (Германия): длина волны возбуждения — 485 нм, длина волны излучения — 527 нм [12].

Определение миелопероксидазы. Концентрацию миелопероксидазы определяли иммуноферментным методом с помощью набора Human MPO ELISA kit (HycultBiotech, Нидерланды).

Определение цитокинов: IL-1, IL-8, TNF- α в сыворотке крови определяли с помощью наборов «Вектор Бест» (Новосибирск), предназначенных для иммуноферментного анализа.

Статистическая обработка. Результаты приведены в виде средних величин. Достоверность выявленных различий и величину связей между измеренными параметрами оценивали методами непараметрической статистики с использованием U-критерия Манна-Уитни, T-критерия Вилкоксона и коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

Этическая экспертиза

Право на участие в исследовании подтверждалось письменным информированным согласием. Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом НИИФКИ (протокол № 24 от 8 сентября 2016 года).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В анализ были включены 63 пациента с РА и 20 пациентов с БА, находившиеся на стационарном лечении в клинике иммунопатологии НИИФКИ (г. Новосибирск).

Исследованная группа пациентов РА состояла из 54 женщин (85%) и 9 мужчин (15%) в возрасте от 22 до 83 лет (медиана — 55 лет). По степени активности заболевания исследуемые были разделены на 3 группы: 1) с низкой активностью (DAS-28 <3,2); 2) с умеренной активностью (DAS-28 — от 3,2 до 5,1); 3) с высокой активностью (DAS-28 >5,1). Исследованная группа пациентов с БА состояла из 12 женщин (60%) и 8 мужчин (40%) в возрасте от 27 до 59 лет (медиана — 45,1 года). По длительности заболевания — от 1 года до 40 лет. Забор крови производился двукратно: в момент поступления и через 10 дней со дня госпитализации.

В исследование включены 28 образцов от условно здоровых доноров, набранных на Пункте забора донорской крови городской клинической больницы № 1 г. Новосибирска.

При анализе данных, полученных в ходе клинико-лабораторного обследования пациентов с РА и БА, в основу было положено предположение о том, что важными факторами патогенеза этих заболеваний выступают изменения баланса хелперов, в значительной степени определяющие специфику клинических проявлений при этих иммунопатологических состояниях. При этом следует ожидать, что интенсивность воспалительных реакций у пациентов с РА, обусловленная преобладанием активности Th1-лимфоцитов, будет более выражена, чем у пациентов с БА, в патогенезе которой доминируют Th2-клетки, и эта картина хорошо согласуется с общим представлением о клинических проявлениях болезни при двух сравниваемых патологиях.

Результаты сравнения параметров воспалительной активности при РА и БА в момент госпитализации пациентов представлены в табл. 1. Из нее видно, что, как и предполагалось, основной лабораторный показатель системного воспаления — уровень С-реактивного белка (СРБ) в крови, существенно увеличенный в группе пациентов с РА (среднее значение — 15,97 мг/л, при норме — до 5 мг/л), оказался почти не изменённым при БА (среднее значение — 5,28 мг/л). Кроме того, из трёх измеренных у больных с БА провоспалительных цитокинов только для TNF- α было обнаружено значимое повышение уровня в крови, в то время как изменения уровней IL-1 и IL-8 были статистически недостоверны (данные приведены в работе [10]). Эти результаты также можно расценивать как свидетельство отсутствия выраженной системной воспалительной реакции у большинства обследованных пациентов с БА.

Индекс N/L (т.е. соотношение «нейтрофилы / лимфоциты» в периферической крови), который в последнее время всё чаще используется при клинических исследованиях различных заболеваний как весьма чувствительный

Таблица 1. Уровни внеклеточной ДНК в крови и показатели интенсивности воспалительных процессов у пациентов с ревматоидным артритом и бронхиальной астмой по сравнению с условно здоровыми донорами

Table 1. Levels of extracellular DNA in the blood and indicators of the intensity of inflammatory processes in patients with rheumatoid arthritis and asthma compared with conditionally healthy donors

Показатели Indicators	Пациенты с ревматоидным артритом Patients with arthritis	Пациенты с бронхиальной астмой Patients with asthma
Уровень внеклеточной ДНК в плазме крови Extracellular DNA level in blood plasma	↑	↓
Уровень С-реактивного белка Level of C-reactive protein	↑	=
Индекс N/L Index N/L	=	=
Нетоз нейтрофилов <i>in vitro</i> : Neutrophil netosis <i>in vitro</i> :		
• спонтанный • spontaneous	↑	=
• после стимуляции форбол-миристат-ацетатом • after phorbol-myristate-acetate stimulation	↑	↑
• индекс стимуляции • index of stimulation	↑	↑
Содержание миелопероксидазы Concentration of myeloperoxidase	↑	↑

Примечание. ↑ — значение параметра существенно повышено; ↓ — значение параметра существенно снижено; = — существенных отличий не выявлено.

Note. ↑ — the parameter value has been significantly increased; ↓ — parameter value is significantly reduced; = — no significant differences were found.

к динамике воспалительных реакций показатель, в данном случае был малоинформативным. Его среднее значение у пациентов с РА (N/L=2,59) даже ниже, чем у пациентов с БА (N/L=4,57), но различия между сравниваемыми группами больных статистически недостоверны ($p=0,33$) за счёт выраженного разброса значений данного показателя у индивидуальных больных в этих группах. Наиболее вероятной причиной этого явления следует считать неоднородность исследуемых нозологических категорий. Так, у пациентов с экзогенной формой БА среднее значение индекса N/L равнялось 2,65, в то время как при эндогенной форме этого заболевания (наиболее тесно связанной с воспалительным процессом в бронхах) оно достигало 5,32. Сходный разброс значений этого индекса наблюдался и в группе пациентов с РА (от 0,70 до 5,14). Таким образом, полученные результаты не дают возможности, ориентируясь на данный показатель, делать какие-либо выводы об активности системного воспаления при сравнении РА и БА.

Несколько иначе обстоит дело с показателями, которые характеризуют активность нейтрофильных лейкоцитов, играющих важную роль в развитии воспалительных реакций в организме. Как видно из табл. 1, состояние этих клеток существенно изменено (по сравнению с донорами) как в группе пациентов с РА, так и в группе больных с БА. Несмотря на то что в условиях *in vitro* нейтрофилы из крови больных не проявляют повышенной интенсивности

спонтанного нетоза (увеличение этого показателя в группе с РА хотя и статистически достоверно, но очень невелико — он повышен лишь на 3% по сравнению с контрольной группой), их способность отвечать реакцией нетоза на внешнюю стимуляцию резко повышена у больных как с РА, так и с БА. Эти результаты неоспоримо свидетельствуют об исходной примированности этих клеток при обеих исследованных патологиях и их повышенной готовности отвечать активацией на воспалительные стимулы. Не менее существенным представляется и тот факт, что в крови больных как с РА, так и с БА обнаружено значимое увеличение содержания миелопероксидазы (все данные представлены в работах [9, 10]). Поскольку этот фермент строго специфичен для нейтрофильных лейкоцитов, повышение его количества в крови обследованных больных прямо свидетельствует о существенной активации у них процессов нетоза *in vivo*. Таким образом, лабораторные показатели подтверждают наличие локального воспаления у пациентов с БА при отсутствии явных симптомов системной воспалительной реакции, в то время как у пациентов с РА воспалительные изменения в суставах сопровождаются повышением уровня СРБ, указывающим на системную реакцию организма в ответ на воспалительные стимулы.

Значимым различием между изучаемыми иммунопатологическими состояниями является обнаруженное

в наших исследованиях (см. табл. 1) существенное снижение уровня внДНК в плазме крови у пациентов с БА, что резко контрастирует с его повышением при РА. Поведение этого показателя в клинике аллергических заболеваний ещё недостаточно изучено, и в литературе удалось найти только два сообщения о непосредственном измерении внДНК в крови при БА [13, 14], не совпадающие с результатами нашего исследования. В одной из этих работ не было обнаружено изменений содержания внДНК в крови при БА по сравнению со здоровыми лицами [13], в то время как в работе G. Varricchi и соавт. описано некоторое увеличение (на 5–10% по сравнению с контролем) данного параметра у пациентов с БА [14]. Однако этот вывод об увеличении количества внДНК в крови больных вызывает определённые сомнения, поскольку указанный в цитируемой работе уровень внДНК у здоровых лиц (2,2 мкг/мл) более чем на два порядка превышает аналогичные данные в статьях, опубликованных другими авторами. Учитывая неоднородность исследуемых групп больных с диагнозом БА, которые представляют собой объединённых в общую нозологическую категорию пациентов с этиологически и патогенетически различными вариантами заболевания, чьи характеристики могут зависеть от случайного распределения больных в конкретной группе, следует, вероятно, считать на сегодняшний день вопрос об уровне внДНК в крови пациентов с БА ещё окончательно не прояснённым и требующим дополнительного изучения и проверки.

Тем не менее полученные в нашем исследовании результаты позволяют с большой степенью уверенности предполагать, что наблюдаемые при БА изменения уровня внДНК в плазме крови не могут объясняться — в отличие от поведения этого показателя при РА — активностью воспалительных реакций при этом заболевании.

Во-первых, при разделении всех обследованных пациентов с БА на три клинически выделяемые фенотипические формы было установлено, что уровень внДНК в этих подгруппах больных был практически одинаков (все данные, характеризующие выделенные подгруппы, приведены в работе [10]). При этом в подгруппе пациентов с экзогенной формой БА (наиболее тесно связанной с активностью Th2-зависимых иммунных реакций) величина показателей воспалительной активности (СРБ, N/L, TNF- α , IL-1 и IL-8) была минимальной, в то время как в подгруппе с эндогенной формой БА (определяемой в основном хроническим воспалительным процессом в дыхательных путях) величина этих показателей была максимальной и намного превышала значения аналогичных параметров при экзогенной форме БА.

Во-вторых, к сходным выводам ведут и результаты корреляционного анализа полученных данных. При обследовании пациентов с РА была обнаружена небольшая, но статистически достоверная корреляция уровня внДНК в плазме крови с показателями воспалительной активности: с уровнем СРБ ($r=+0,270$; $p < 0,05$) и с клинически определяемой оценкой степени воспалительной

активности в поражённых суставах DAS-28 ($r=+0,319$; $p < 0,05$). Кроме того, уровни внДНК при РА достаточно тесно связаны с содержанием в крови миелопероксидазы (параметром, отражающим интенсивность нетоза *in vivo*): $r=+0,412$ ($p < 0,05$). Совершенно иначе выглядят результаты корреляционного анализа данных, полученных при обследовании пациентов с БА: уровень внДНК в плазме крови у индивидуальных больных не коррелирует ни с одним из измеренных провоспалительных цитокинов, ни с СРБ, ни с уровнем миелопероксидазы в крови (коэффициенты ранговой корреляции для этих параметров близки к нулю и статистически недостоверны).

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты нашего исследования не дают достаточных оснований предполагать, что при БА интенсивность воспалительных процессов может оказаться одним из факторов, активно влияющих на содержание внДНК в плазме крови больных. Полученные данные свидетельствуют скорее о том, что в этом случае уровень внДНК определяется некими иными — ещё неизвестными нам сегодня — патофизиологическими процессами и механизм регуляции этого параметра не связан напрямую с выраженностью системного или местного воспаления.

Следует отметить, что среди результатов проведённого исследования наибольшее внимание привлекает заметное снижение уровня внДНК в плазме крови, выявленное у пациентов с БА. В литературе удалось обнаружить лишь сообщение о некотором уменьшении этого параметра (по сравнению с контролем) у лиц, подвергавшихся хроническому воздействию ионизирующей радиации [15], но не встречаются данные о подобной динамике внДНК при каких-либо заболеваниях и патологических состояниях у человека и животных. В связи с этим несомненный интерес представляют вопросы о том, каковы могут быть физиологические механизмы, способные приводить к возникновению подобных эффектов, и какое патогенетическое и диагностическое значение может иметь падение содержания внДНК в крови больных ниже уровня, определяемого у здоровых индивидов.

Хотя сам факт понижения уровня внДНК у пациентов с БА требует, как уже отмечалось ранее, проверки и дальнейшего изучения, всё же уже сегодня мы можем высказать некоторые предположения о причинах подобных изменений указанного параметра при БА.

Во-первых, имеет смысл проверить возможность влияния на содержание внДНК в крови той специфической терапии, воздействию которой подвергаются больные БА. Все участвовавшие в проведённом исследовании пациенты с БА получали на постоянной основе небольшие дозы глюкокортикоидных препаратов, вводимых в виде спрея в дыхательные пути, так что нельзя полностью исключить влияние этих лекарств на измеряемые параметры. Поскольку кортизол способен увеличивать значение

индекса N/L [16], то обнаруженные у больных с БА довольно высокие значения этого индекса (несмотря на отсутствие у них симптомов выраженного системного воспаления) можно расценить как дополнительный — хотя и не слишком весомый — аргумент в пользу возможности такого влияния гормонов на характеристики больных при терапии БА. К сожалению, в литературе, наряду с большим количеством работ о повышении вДНК при воспалительных процессах различного генеза, отсутствуют данные, отвечающие на вопрос о возможности снижения её уровня в крови вследствие терапии глюкокортикоидными гормонами и другими противовоспалительными препаратами. Таким образом, одним из значимых результатов сравнительного исследования количества вДНК в крови пациентов с РА и БА является вывод о настоятельной необходимости экспериментального изучения эффектов некоторых гормонов и лекарств с противовоспалительной активностью в отношении обсуждаемого параметра.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Можно предположить (на правах гипотезы, имеющей право на существование, но сегодня еще не подкреплённой фактами), что состояние Th1-/Th2-баланса представляет собой один из значимых регуляторов, определяющих концентрацию вДНК в крови. Сдвиг данного соотношения в сторону преобладания Th1-клеток должен, согласно предлагаемой гипотезе, способствовать развитию воспалительных процессов в организме и увеличивать количество вДНК, в то время как сдвиг баланса хелперов в сторону доминирования Th2-лимфоцитов должен подавлять эти процессы и приводить к снижению вДНК в крови. Однако для проверки данного предположения требуются серьёзные экспериментальные исследования на лабораторных моделях иммунопатологических процессов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Исследование проведено за счёт средств федерального бюджета для выполнения

государственного задания на научно-исследовательскую работу «Изучение иммунопатогенеза фенотипов социально значимых заболеваний человека и полиморбидности как основа для разработки новых методов персонализированной диагностики и лечения» (РК № 122012000366-9).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией). Наибольший вклад распределён следующим образом: Н.Н. Вольский — статистическая обработка и анализ результатов, написание текста статьи; Е.Н. Демченко — сбор и обработка биологического материала, обсуждение материалов; Е.В. Гойман — сбор и обработка биологического материала, оформление ссылок и таблиц; В.А. Козлов — формулировка идеи; Е.Д. Гаврилова — концепция и дизайн исследования, редактирование статьи.

ADDITIONAL INFORMATION

Funding source. The study was carried out at the expense of the federal budget to fulfill the state assignment for research work “Study of the immunopathogenesis of phenotypes of socially significant human diseases and multimorbidity as the basis for the development of new methods of personalized diagnosis and treatment” (No. 122012000366-9).

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contribution. All authors confirm that their authorship meets the international ICMJE criteria (all authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work). N.N. Volskiy — statistical processing and analysis of results, writing the text of the article; E.N. Demchenko — collection and processing of biological material, discussion of materials; E.V. Goiman — collection and processing of biological material, preparation of links and tables; V.A. Kozlov — formulation of the idea; E.D. Gavrilova — concept and design of the study, article editing.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Козлов В.А. Свободная внеклеточная ДНК в норме и при патологии // Медицинская иммунология. 2013. Т. 15, № 5. С. 399–412. doi: 10.15789/1563-0625-2013-5-399-412
2. Chornenki N.L.J., Coke R., Kwong A.C., et al. Comparison of the source and prognostic utility of cfDNA in trauma and sepsis // Intensive Care Med. 2019. Vol. 7, N 1. P. 29. doi: 10.1186/s40635-019-0251-4
3. Duvvuri B., Lood C. Cell-free DNA as a biomarker in autoimmune rheumatic diseases // Front Immunol. 2019. Vol. 10. P. 502. doi: 10.3389/fimmu.2019.00502
4. Rykova E., Sizikov A., Roggenbuck D., et al. Circulating DNA in rheumatoid arthritis: pathological changes and association with clinically used serological markers // Arthritis Res Ther. 2017. Vol. 19, N 1. P. 85. doi: 10.1186/s13075-017-1295-z
5. Демченко Е.Н., Гаврилова Е.Д., Гойман Е.В., и др. 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
6. Grabuschnig S., Bronkhorst A.J., Holdenrieder S., et al. Putative origins of cell-free DNA in humans: A review of active and passive nucleic acid release mechanisms // Int J Mol Sci. 2020. Vol. 21, N 21. P. 8062. doi: 10.3390/ijms21218062
7. Van der Meer A.J., Kroeze A., Hoogendijk A.J., et al. Systemic inflammation induces release of cell-free DNA from hematopoietic and parenchymal cells in mice and humans // Blood Adv. 2019. Vol. 3, N 5. P. 724–728. doi: 10.1182/bloodadvances.2018018895

8. 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. doi: 10.20538/1682-0363-2017-4-155-164
9. Гаврилова Е.Д., Демченко Е.Н., Гойман Е.В., и др. Внеклеточная ДНК в плазме крови и активность нейтрофильных лейкоцитов у пациентов с ревматоидным артритом // Российский иммунологический журнал. 2022. Т. 25, № 2. С. 147–154. doi: 10.46235/1028-7221-1110-PED
10. Гаврилова Е.Д., Гойман Е.В., Демченко Е.Н., и др. Особенности изменения уровня внеклеточной ДНК, показателей нетоза и воспаления в периферической крови у пациентов с бронхиальной астмой // Российский иммунологический журнал. 2023. Т. 26, № 4. С. 533–540. doi: 10.46235/1028-7221-13925-CCO
11. Tamkovich S.N., Litviakov N.V., Bryzgunova O.E., et al. Cell-surface-bound circulating DNA as a prognostic factor in lung cancer // *Ann N Y Acad Sci*. 2008. Vol. 1137, N 1. P. 214–217. doi: 10.1196/annals.1448.042
12. Barrientos L., Marin-Esteban V., Chaisemartin L., et al. An improved strategy to recover large fragments of functional human

- neutrophil extracellular traps // *Frontiers of Immunology*. 2013. Vol. 4. P. 166. doi: 10.3389/fimmu.2013.00166
13. Szepechinski A., Chorostowska-Wynimko J., Struniawski R., et al. Cell-free DNA levels in plasma of patients with non-small-cell lung cancer and inflammatory lung disease // *Br J Cancer*. 2015. Vol. 113, N 3. P. 476–483. doi: 10.1038/bjc.2015.225
14. Varricchi G., Modestino L., Poto R., et al. Neutrophil extracellular traps and neutrophil-derived mediators as possible biomarkers in bronchial asthma // *Clin Exp Med*. 2022. Vol. 22, N 2. P. 285–300. doi: 10.1007/s10238-021-00750-8
15. Костюк С.В., Замулаева И.А., Агапова Р.К., и др. Изменение свойств внеклеточной ДНК периферической крови и частоты TCR-мутантных клеток при действии на организм человека ионизирующей радиации // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2008. Т. 48, № 1. С. 5–13. EDN: ICEEHT
16. Wang W., Wang J., Shen C., et al. Neutrophil-lymphocyte ratio as an initial screening biomarker for differential diagnosis of Cushing's syndrome from nonfunctional adenoma in patients with an adrenal mass // *Biomed Res Int*. 2021. Vol. 2021. P. 6635594. doi: 10.1155/2021/6635594

REFERENCES

1. Kozlov VA. Free extracellular DNA in normal state and under pathological conditions. *Medical Immunology (Russia)*. 2013;15(5):399–412. (In Russ). doi: 10.15789/1563-0625-2013-5-399-412
2. Chornenki NLJ, Coke R, Kwong AC, et al. Comparison of the source and prognostic utility of cfDNA in trauma and sepsis. *Intensive Care Med Exp*. 2019;7(1):29. doi: 10.1186/s40635-019-0251-4
3. Duvvuri B, Lood C. Cell-free DNA as a biomarker in autoimmune rheumatic diseases. *Front Immunol*. 2019;10:502. doi: 10.3389/fimmu.2019.00502
4. Rykova E, Sizikov A, Roggenbuck D, et al. Circulating DNA in rheumatoid arthritis: pathological changes and association with clinically used serological markers. *Arthritis Res Ther*. 2017;19(1):85. doi: 10.1186/s13075-017-1295-z
5. Demchenko EN, Gavrilova ED, Goiman EV, et al. Extracellular DNA in blood: an index of in vivo inflammatory response. *Medical Immunology (Russia)*. 2022;24(4):853–860. (In Russ). doi: 10.15789/1563-0625-EDI-2504
6. Grabuschnig S, Bronkhorst AJ, Holdenrieder S, et al. Putative origins of cell-free DNA in humans: A review of active and passive nucleic acid release mechanisms. *Int J Mol Sci*. 2020;21(21):8062. doi: 10.3390/ijms21218062
7. Van der Meer AJ, Kroeze A, Hoogendijk AJ, et al. Systemic inflammation induces release of cell-free DNA from hematopoietic and parenchymal cells in mice and humans. *Blood Adv*. 2019;3(5):724–728. doi: 10.1182/bloodadvances.2018018895
8. Kolesnikova OP, Goiman EV, Demchenko EN, Gavrilova ED, Kozlov VA. Early markers of phenotypic heterogeneity in the induced model of systemic lupus erythematosus. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2017;16(4):155–164. (In Russ). doi: 10.20538/1682-0363-2017-4-155-164
9. Gavrilova ED, Demchenko EN, Goiman EV, et al. Plasma extracellular DNA and neutrophilic leukocyte activity in patients with rheumatoid arthritis. *Russian Journal of Immunology*. 2022;25(2):147–154. (In Russ). doi: 10.46235/1028-7221-1110-PED
10. Gavrilova ED, Goiman EV, Demchenko EN, et al. Characteristic changes of extracellular DNA levels, indices of netosis and inflammation in peripheral blood in patients with asthma. *Russian Journal of Immunology*. 2023;26(4):533–540. (In Russ). doi: 10.46235/1028-7221-13925-CCO
11. Tamkovich SN, Litviakov NV, Bryzgunova OE, et al. Cell-surface-bound circulating DNA as a prognostic factor in lung cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1137(1):214–217. doi: 10.1196/annals.1448.042
12. Barrientos L, Marin-Esteban V, Chaisemartin L, et al. An improved strategy to recover large fragments of functional human neutrophil extracellular traps. *Frontiers of Immunology*. 2013;4:166. doi: 10.3389/fimmu.2013.00166
13. Szepechinski A, Chorostowska-Wynimko J, Struniawski R, et al. Cell-free DNA levels in plasma of patients with non-small-cell lung cancer and inflammatory lung disease. *Br J Cancer*. 2015;113(3):476–483. doi: 10.1038/bjc.2015.225
14. Varricchi G, Modestino L, Poto R, et al. Neutrophil extracellular traps and neutrophil-derived mediators as possible biomarkers in bronchial asthma. *Clin Exp Med*. 2022;22(2):285–300. doi: 10.1007/s10238-021-00750-8
15. Kostyuk SV, Zamulaeva IA, Agapova RK, et al. The changing of cell-free DNA properties of peripheral blood and TCR-mutant cell frequency in individuals exposed to ionizing radiation. *Radiation biology. Radioecology*. 2008;48(1):5–13. (In Russ). EDN: ICEEHT
16. Wang W, Wang J, Shen C, et al. Neutrophil-lymphocyte ratio as an initial screening biomarker for differential diagnosis of Cushing's syndrome from nonfunctional adenoma in patients with an adrenal mass. *Biomed Res Int*. 2021;2021:6635594. doi: 10.1155/2021/6635594

ОБ АВТОРАХ

*** Гаврилова Елена Давидовна**, канд. биол. наук;
адрес: Россия, 630099, Новосибирск, улица Ядринцевская, д. 14;
ORCID: 0000-0002-2014-3397;
eLibrary SPIN: 7062-5818;
e-mail: edav.gavr@mail.ru

Вольский Николай Николаевич, канд. мед. наук;
ORCID: 0000-0002-9341-1997;
eLibrary SPIN: 6089-5244;
e-mail: dtheory@yandex.ru

Демченко Елена Николаевна, канд. хим. наук;
ORCID: 0009-0001-5178-5616;
eLibrary SPIN: 2269-1820;
e-mail: elena.demchenko@gmail.com

Гойман Елена Владимировна, канд. мед. наук;
ORCID: 0000-0002-6443-6917;
eLibrary SPIN: 6886-9372;
e-mail: lgoiman@mail.ru

Козлов Владимир Александрович, д-р мед. наук, профессор;
ORCID: 0000-0002-1756-1782;
eLibrary SPIN: 3573-7490;
e-mail: vakoz40@mail.ru

AUTHORS' INFO

*** Elena D. Gavrilova**, Cand. Sci. (Biology);
address: 14 Yadrintsevskaya street, 630099 Novosibirsk, Russia;
ORCID: 0000-0002-2014-3397;
eLibrary SPIN: 7062-5818;
e-mail: edav.gavr@mail.ru

Nikolay N. Volskiy, MD, Cand. Sci. (Medicine);
ORCID: 0000-0002-9341-1997;
eLibrary SPIN: 6089-5244;
e-mail: dtheory@yandex.ru

Elena N. Demchenko, Cand. Sci. (Chemistry);
ORCID: 0009-0001-5178-5616;
eLibrary SPIN: 2269-1820;
e-mail: elena.demchenko@gmail.com

Elena V. Goiman, MD, Cand. Sci. (Medicine);
ORCID: 0000-0002-6443-6917;
eLibrary SPIN: 6886-9372;
e-mail: lgoiman@mail.ru

Vladimir A. Kozlov, MD, Dr. Sci. (Medicine), Professor;
ORCID: 0000-0002-1756-1782;
eLibrary SPIN: 3573-7490;
e-mail: vakoz40@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author