

УДК 616.248:616-097:616-092.4

DOI: 10.14427/jipai.2021.4.34

## Оценка ловушкообразования нейтрофилами с использованием гексаазотированного фуксина и определение абзимной активности иммуноглобулинов классов А и М у пациентов с бронхиальной астмой и ХОБЛ

С.И. Генералов, О.В. Ищенко, С.А. Сушкова, И.И. Генералов

Витебский государственный медицинский университет

### Detection of neutrophil extracellular traps formation using the hexaazotated fuchsin and determination of the immunoglobulin classes A and M abzyme activity in patients with bronchial asthma and COPD

S.I. Generalov, O.V. Ishchenko, S.A. Sushkova, I.I. Generalov

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

#### Аннотация

Образование нейтрофильных внеклеточных ловушек и абзимная активность иммуноглобулинов – значимые компоненты врожденного иммунитета. В настоящей работе оценивали показатели спонтанного и индуцированного ловушкообразования нейтрофилов, различные виды протеолитической и оксидоредуктазной абзимной активности у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) и бронхиальной астмой (БА). Ловушкообразование определяли при помощи как световой, так и флуоресцентной микроскопии, используя разработанный нами метод окрашивания. Установлено повышение уровня индуцированного ловушкообразования у пациентов с ХОБЛ относительно пациентов с БА. Обнаружено достоверное повышение пероксидазной активности иммуноглобулинов класса А у пациентов с БА в сравнении с таковой в группе с ХОБЛ. Получены данные по гиалуронидазной, каталазной, эластазной, дипептидилпептидаза-4 подобной активности иммуноглобулинов классов А и М. Установлена корреляция между пероксидазной и каталазной активностью иммуноглобулинов класса А у пациентов с БА.

#### Ключевые слова

Нетоз, нейтрофильные внеклеточные ловушки, бронхиальная астма, ХОБЛ, абзимы.

#### Введение

Нейтрофильные внеклеточные ловушки (НВЛ) – сетеподобные структуры, представля-

#### Summary

Netosis and abzyme activity are the significant components of the innate immunity. Spontaneous and induced netosis, various types of proteolytic and oxidoreductase abzyme activity in patients with COPD and BA were determined in this study. NETs were determined by both light and fluorescence microscopy using a previously developed staining method. As a result of the work, an increase of the induced netosis was found in patients with COPD, relative to patients with BA. A significant increase in the IgA peroxidase activity was found in patients with BA relative to patients with COPD. Data on hyaluronidase, catalase, elastase, dipeptidyl dipeptidase-4-similar activity were obtained. A correlation between the peroxidase and catalase activity of IgA in patients with BA was found.

#### Keywords

Netosis, neutrophil extracellular traps, bronchial asthma, COPD, abzyme.

ющие собой сплетение нитей ДНК в комплексе с гистонами и содержимым нейтрофильных гранул. Данные структуры образуются в процессе

нетоза – особого способа осуществления нейтрофилами реакций системы иммунитета в процессах стерильного и нестерильного воспаления [1]. Нетоз развивается в результате воздействия на клетку различными стимуляторами. *In vitro* чаще всего применяют фобол-12-миристат-13-ацетат или ионофоры кальция. *In vivo* активаторами нетоза могут служить компоненты бактерий вирусов и грибков, провоспалительные цитокины, молекулярные паттерны, ассоциированные с патогенами или повреждением. После связывания веществ-активаторов с паттерн-распознающими рецепторами происходит выход ионов кальция из эндоплазматического ретикула. Увеличение уровня внутриклеточного кальция приводит к активации НАДФ-оксидазы и продукции активных форм кислорода, которые повреждают гранулы нейтрофила и ядерную оболочку, что оканчивается смешиванием гранулярного и ядерного содержимого. Находящиеся в азурофильных гранулах ферменты – миелопероксидаза и эластаза – запускают процесс деконденсации хроматина. Параллельно происходит цитрулинирование гистонов ферментом пептидил-аргинин-деиминазой 4. Затем происходит разрыв мембраны нейтрофила и выход ДНК в комплексе с антибактериальными протеинами, нейтрофильными ферментами и гистонами во внеклеточное пространство. В результате происходит образование различных типов нейтрофильных внеклеточных ловушек: в образцах тканей и биологических жидкостей можно наблюдать НВЛ в форме облаков или нитей [2, 3].

Образование НВЛ является важной частью врожденного антибактериального иммунитета. Избыточное ловушкообразование приводит к аутовоспалительному поражению тканей, тем самым участвуя в развитии широкого спектра патологий, особенно при дефиците эндогенных нуклеаз – естественных ингибиторов ловушкообразования в организме. Это обуславливает двойственное значение нетоза. В частности, повышенное ловушкообразование отмечается при различных поражениях органов дыхания: хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) [4], инфекции COVID-19 [5], бронхиальной астме (БА) и других. Продукты нетоза стимулируют Т-хелперы 17 типа, с последующим выбросом ими интерлейкина-17, что приводит к усилению воспалительного процесса. Этот механизм персистенции воспаления был описан у пациентов с БА [6]. Существуют исследования, показывающие, что повышенный уровень нетоза стимулирует прогрессирование ХОБЛ [7]. Повышение

ловушкообразования может послужить диагностическим критерием для дифференциации различных фенотипов хронических обструктивных заболеваний дыхательных путей, прогнозирования течения и определения степени тяжести болезни. В то же время пониженная способность нейтрофилов к нетозу может свидетельствовать о наличии дефицита в системе иммунитета [8].

Действие НВЛ связано с различными протеолитическими, оксидоредуктазными и другими ферментами [2]. Помимо нетоза существуют и другие компоненты врожденного иммунитета, основанные на ферментативном действии. К ним, в частности, относится собственная каталитическая активность иммуноглобулинов (Ig) различных классов – абзимная активность.

Абзимная активность иммуноглобулинов классов G и A ассоциирована со многими патологическими состояниями, в первую очередь, аутоиммунными [9]. Предполагается, что иммуноглобулины класса A обладают более ярко выраженной абзимной активностью в сравнении с иммуноглобулинами класса G [10]. Существуют единичные работы, связанные с абзимной активностью иммуноглобулинов класса M [11, 12]. Известно, что иммуноглобулины класса M выделяются при первичном попадании инфекционного агента. В свою очередь, течение как ХОБЛ, так и БА напрямую зависит от перенесенных инфекций. Так как иммуноглобулины класса M могут сохраняться до 8 месяцев [13] после перенесенной инфекции, они могут оказывать воздействие на состояние основного заболевания пациентов и после окончания инфекционного процесса, особенно с учетом длительно текущего абзимного катализа. Поскольку сывороточные иммуноглобулины M несут на себе 10 сайтов связывания антигена, обладая при этом высокой авидностью, изучение их абзимной активности представляется достаточно обоснованным. При этом абзимы могут проявлять активность по отношению к достаточно широкому спектру субстратов, в том числе и к субстратам нетоза.

Таким образом, целью настоящего исследования стало определение спонтанного и индуцированного ловушкообразования нейтрофилами пациентов с ХОБЛ и БА, а также изучение абзимной активности IgM и IgA при данных патологиях.

### Методы исследования

В качестве материала исследования для определения НВЛ были использованы нейтрофилы, выделенные из венозной крови 24 пациентов с БА и 9 пациентов с ХОБЛ. Исследуемые группы

были однородны по полу в группе пациентов с БА (мужчин (М):11, женщин (Ж):13) и ХОБЛ (М:5, Ж:4), однако различались по возрасту, 63(56:69) г. в группе ХОБЛ и 31(20:52) г. в группе БА. Для определения абзимной активности в качестве материала для исследования были использованы сыворотки 7 пациентов с БА и 7 пациентов с ХОБЛ. Группы были однородны по полу в группе пациентов с БА (М:4, Ж:3) и ХОБЛ (М:3, Ж:4), однако различались по возрасту, 63 (56:69) г. в группе ХОБЛ и 21 (20:35) г. в группе БА.

### Контингент пациентов

В исследование включали пациентов с ХОБЛ с частыми обострениями (более 2 раз за последний год) и выраженными симптомами, по оценке степени риска пациенты соответствовали группе D [14]; пациентов с аллергической формой БА. В исследование не включали пациентов, имеющих иные хронические заболевания в стадии обострения, также были исключены пациенты с диагностированным COVID-19.

Исследуемая выборка пациентов представляет лиц, выбранных случайным образом из пациентов ХОБЛ и БА, находившихся на лечении в учреждении здравоохранения «Витебская областная клиническая больница». Пациенты были включены в исследование после получения исследователем информированного согласия. Работа одобрена этическим комитетом Витебского государственного медицинского университета.

Постановку диагнозов ХОБЛ и БА, оценку степени тяжести заболевания проводили на основании рекомендаций и критериев Глобальной инициативы по ХОБЛ (GOLD) и Глобальной инициативе по бронхиальной астме (GINA).

### Определение ловушкообразования

Забор крови проводили на второй день поступления пациента в стационар утром натощак в пробирки объемом 3 мл, содержащие 3,2% раствор цитрата натрия. Выделение гранулоцитов проводили на заранее приготовленном двойном градиенте плотности Histopaque®-1,119 и Histopaque®-1077 согласно описанной ранее методике [15]. Затем клеточную суспензию разводили в 0,01М фосфатном буферном растворе рН 7,4 (PBS) до концентрации в  $5 \times 10^5$  клеток/мл. Жизнеспособность клеток определяли при помощи окраски 0,4% раствором трипанового синего.

Заранее готовили камеры для работы с клетками из биологически инертного силикона на предметных стеклах с адгезивным покрытием

Polyzine производства Thermo Fisher Scientific. В каждую камеру вносили по 300 мкл гранулоцитарной взвеси. В камеры, предназначенные для определения индуцированного ловушкообразования, добавляли стандартный активатор нетоза – форбол-миристан-ацетат (ФМА) с конечной концентрацией в 50 нг/мл – 7,5 мкл ФМА на 300 мкл нейтросуспензии. В камеры, предназначенные для определения спонтанного ловушкообразования, добавляли по 7,5 мкл стерильного раствора PBS. Камеры закрывали и инкубировали в термостате при температуре 37°C на протяжении 3 часов. По истечении времени инкубации препараты фиксировали раствором параформальдегида в течение 10 минут. После фиксации силиконовую камеру удаляли.

Окрашивание проводили разработанным ранее способом [15] с использованием гексаазотированного фуксина и метилового зеленого с определением нафтол-AS-D хлорацетатэстеразы – специфического для нейтрофилов фермента, и ДНК.

При этом следует отметить, что до сих пор не проводилось сравнения данного метода окрашивания с его флуоресцентными аналогами. Поэтому с целью одновременного использования как световой, так и флуоресцентной микроскопии для выявления НВЛ препараты дополнительно окрашивали раствором Hoechst 33342. Данный краситель традиционно применяется для флуоресцентной визуализации ДНК, в том числе и при определении НВЛ. Поскольку Hoechst 33342 окрашивает ДНК за счет связывания с участками богатыми аденином и тиминном, а метиловый зеленый, напротив, связывается в основном с гуанином и цитозином, параллельное применение двух красителей не оказывает существенного влияния на качество окрашивания. Окрашивание проводили раствором в концентрации 5 мкг/мл на PBS в течение 10 минут в темноте.

Поскольку препараты были окрашены гексаазотированным фуксином с образованием продукта ферментативной реакции красного цвета, который можно наблюдать также при помощи флуоресцентной микроскопии, в разработанном методе отсутствовала необходимость в дополнительном иммунофлуоресцентном окрашивании препаратов с использованием фермент-специфических антител.

После окрашивания препараты исследовали при помощи микроскопов БИОМЕД-6 ПР-1 Т и Leica DM 2000 на объективах 40X/0,65, 63X/075 и иммерсионном объективе 100X1,25. Одни и те

же участки просматривали как с использованием флуоресцентной, так и при помощи световой микроскопии. Изображения были получены при помощи камер Leica DFC295 и Canon EOS 100D с использованием программного обеспечения Leica Application Suite V4.6 и EOS Utility.

### Определение абзимной активности

Для выделения иммуноглобулинов с последующим определением абзимной активности проводили двукратную преципитацию белка сыворотки полунасыщенным раствором сульфата аммония. Далее раствор, содержащий белки, последовательно пропускали через хроматографические колонки, содержащие в себе агарозу, конъюгированную с anti-IgM и anti-IgA. Комбинированное использование агарозы, конъюгированной с анти-IgA и анти-IgM, позволило выделить иммуноглобулины классов А и М из одного образца сыворотки крови пациента. Антитела элюировали глицин-HCl буферным раствором. Затем растворы антител довели до концентрации в 100 мкг/мл. БАПНА-амидазную, эластазную, катепсиноподобную, дипептидилпептидаза-4-подобную, каталазную и пероксидазную реакцию определяли согласно ранее описанным методам [16]. Измерение ферментативной активности проводили после 20 часов инкубации. Учет реакций проводили на многоканальном фотометре. Результаты выражали в условных единицах (Ед), соответствующих оптической плотности.

ДНКазную и гиалуронидазную активность измеряли в центрифужных стеклянных пробирках полуколичественным методом риванолового сгустка [17].

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием программного обеспечения Statistica 10 и Microsoft Excel. Определяли медиану изучаемых показателей, верхний и нижний квартиль (Me, 25%; 75%). Достоверность различий устанавливали по U критерию Манна-Уитни. Для определения взаимосвязи изучаемых параметров рассчитывали ранговые корреляции Спирмена. Значения  $p < 0,05$  считали статистически значимыми.

### Результаты и обсуждение

Нейтрофильные внеклеточные ловушки определяли как скопления ядерного материала и прореагировавшего субстрата, превышающие по размеру интактные гранулоциты в препаратах спонтанного и индуцированного ловушкообразования (рис 1, 2, 3).

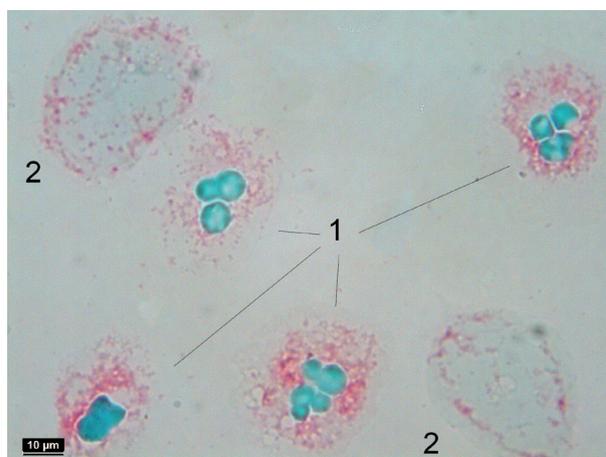
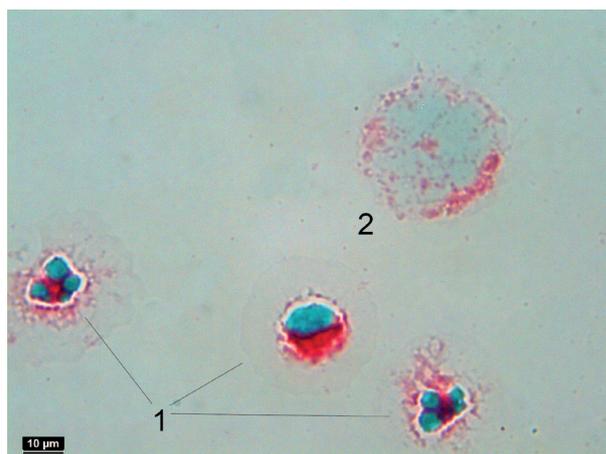


Рис 1, 2. Нейтрофильная внеклеточная ловушка (2) и сегментоядерные нейтрофилы (1). Увеличение 100X. Окрашивание гексаазотированным фуксином и метиловым зеленым.

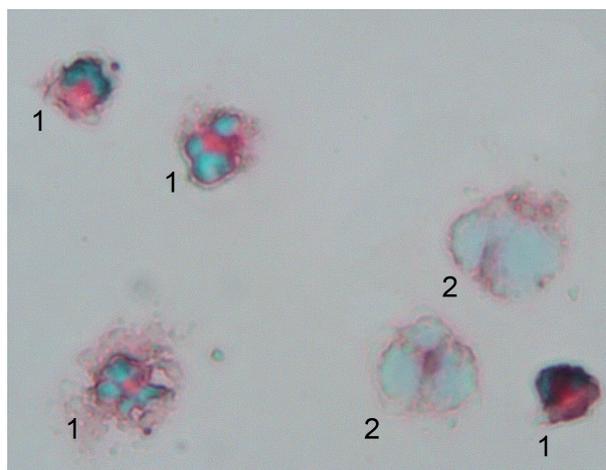


Рис 3. Нейтрофильные внеклеточные ловушки (2) и сегментоядерные нейтрофилы (1). Увеличение 40X. Окрашивание гексаазотированным фуксином и метиловым зеленым.

Морфологические элементы, определяемые в одних и тех же участках при помощи световой и флуоресцентной микроскопии, были идентичны, что позволяет ограничиться более простой световой микроскопией при определении НВЛ (рис 4).

Для сравнения спонтанного и индуцированного ловушкообразования у пациентов с БА и ХОБЛ (табл. 1) оценивали их относительные величины в процентах – число нейтрофильных внеклеточных ловушек на 100 нейтрофилов.

Выявлено превышение спонтанного ловушкообразования у пациентов с БА по сравнению с ХОБЛ. Напротив, индуцированное ловушкообразование было выше в группе ХОБЛ. Полученные различия не являются статистически достоверными, вероятно, в связи с малым размером исследуемых групп. Требуется расширение выборки для установления статистической значимости обнаруженных изменений. В свою очередь, индуцированный нетоз в обеих группах превышал значения, ранее установленные для здоровых лиц – 11,6 (9,5;13,7) [18]. Готовность нейтрофилов к повышенному ловушкообразованию у пациентов с хроническими обструктивными заболеваниями вносит вклад в понимание иммунопатогенеза прогрессирования и хронизации воспаления. Известно, что уровень внеклеточной ДНК нейтрофильных ловушек обратно коррелирует с функцией легких [19], в том числе со степенью ограничения воздушного потока  $ОФВ_1$  [20] и частотой обострений [21]. У стабильных пациентов с ХОБЛ образование НВЛ нейтрофилами мокроты и уровни внекле-

точной ДНК в супернатанте мокроты значительно увеличены независимо от текущего статуса курения и гнойности образца мокроты [22].

#### Абзимная активность иммуноглобулинов классов А и М у пациентов с ХОБЛ и БА

Каталазная активность иммуноглобулинов классов А и М у пациентов в обеих группах была сходна между собой (табл. 2), при этом суммарная каталазная активность иммуноглобулинов у пациентов с ХОБЛ была достоверно выше, чем у пациентов с БА.

Как у пациентов с ХОБЛ, так и у пациентов с БА иммуноглобулины классов А и М проявили сопоставимую, и при этом минимальную, фоновую активность в отношении субстрата эластазы (табл. 3).

Пероксидазная активность практически не выявлялась у иммуноглобулинов классов А и М пациентов с ХОБЛ. Соответственно, выявленная у пациентов с БА пероксидазная активность иммуноглобулинов класса А достоверно выше, чем у пациентов с ХОБЛ (табл. 4).

Дипептидилпептидаза-4 подобная активность у пациентов с ХОБЛ и БА проявлялась достаточно неоднородно. Так, иммуноглобулины класса М у 6 пациентов с БА из 7 оказали тормозящий либо нейтральный эффект на спонтанный распад субстрата, в то время как иммуноглобулины М одного пациента обнаружили достоверную абзимную активность. Аналогичным образом повели себя иммуноглобулины М у пациентов с ХОБЛ. Иммуноглобулины класса А у пациентов с

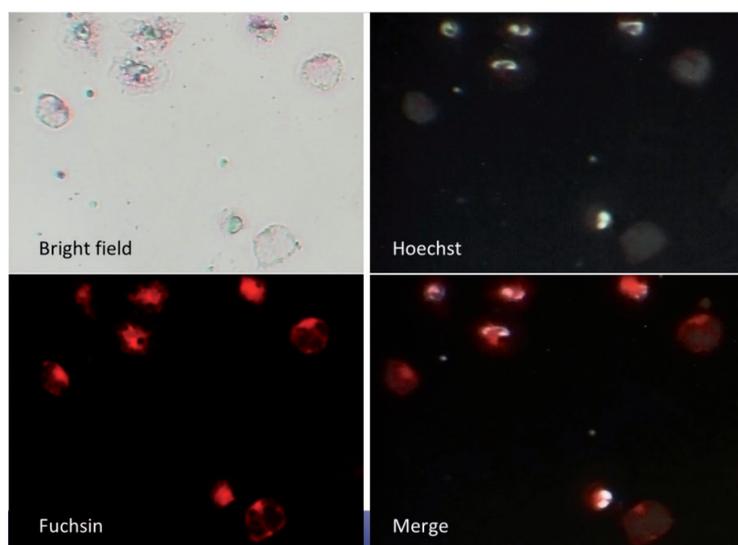


Рис. 4. Сегментоядерные нейтрофилы и нейтрофильные внеклеточные ловушки. Окрашивание гексаазотированным фуксином, метиловым зеленым и Hoechst 33342. Увеличение 40X.

БА и ХОБЛ также проявили ингибирующий или нейтральный эффект в 6 случаях из 7. В целом относительно субстрата дипептидилпептидазы-4 иммуноглобулины обоих классов, выделенные у пациентов с БА, оказали более выраженный суммарный тормозящий эффект, в сравнении с иммуноглобулинами, полученными от пациентов с ХОБЛ (табл. 5).

Иммуноглобулины класса А двух пациентов с бронхиальной астмой проявили средневыраженную активность по отношению к гиалуроновой кислоте (2,5 балла).

Не было обнаружено абзимной активности иммуноглобулинов классов А и М в отношении субстратов катепсинов В и G, БАПНА-амидазы и ДНКазы.

**Таблица 1. Спонтанное и индуцированное ловушкообразование у пациентов с ХОБЛ и БА (Ме (25%; 75%))**

Вид ловушкообразования	Спонтанное ловушкообразование		Индуцированное ловушкообразование	
	ХОБЛ, n=9	БА, n=24	ХОБЛ, n=9	БА, n=24
Группы пациентов				
Нейтрофильные внеклеточные ловушки, %	1,5 (1;3)*	4 (1;6)*	19 (13;20)#	13 (9,5;20,5)#

Примечание: \*p=0,08; # p=0,19

**Таблица 2. Абзимная активность иммуноглобулинов в отношении субстрата каталазы (Ме (25%; 75%))**

Группы пациентов	ХОБЛ, n=7		БА, n=7	
	IgA	IgM	IgA	IgM
Абзимная активность, Ед	0,26(0,18;0,45)*	0,29(0,20;0,46)**	0,17(0,15;0,30)	0,21(0,17;0,29)
Суммарная абзимная активность, Ед	0,26(0,18;0,45)#		0,17(0,15;0,30)	

Примечание: \*p=0,09; \*\* p=0,26; #p=0,049

**Таблица 3. Абзимная активность иммуноглобулинов в отношении субстрата эластазы (Ме (25%; 75%))**

Группы пациентов	ХОБЛ, n=7		БА, n=7	
	IgA	IgM	IgA	IgM
Абзимная активность, Ед	0,011 (0,0046;0,0136)*	0,009 (0,0046;0,0126)#	0,0076 (0,0006;0,01)	0,006 (0,005;0,009)

Примечание: \*p=0,71; #p=0,45

**Таблица 4. Абзимная активность иммуноглобулинов в отношении субстрата пероксидазы (Ме (25%; 75%))**

Группы пациентов	ХОБЛ, n=7		БА, n=7	
	IgA	IgM	IgA	IgM
Абзимная активность, Ед	0,0 (0,0; 0,0)*	0,0 (0,0; 0,0)#	0,024 (0,00;0,39)	0,0 (0,00; 0,12)

Примечание: \*p=0,03; #p=0,47

**Таблица 5. Суммарный эффект иммуноглобулинов обоих классов в отношении субстрата дипептидилпептидазы-4 (Ме (25%; 75%))**

Группы пациентов	ХОБЛ, n=12*	БА, n=12*
Ингибирование распада субстрата, Ед	-0,005 (-0,017; 0,013)#	-0,077 (-0,17;-0,019)

Примечание: \*не включены иммуноглобулины, оказавшие выраженную абзимную активность; #p=0,01

Также обнаружены некоторые статистически значимые ранговые корреляции Спирмена между исследуемыми параметрами. У пациентов с бронхиальной астмой пероксидазная активность иммуноглобулинов класса А коррелирует с каталазной IgA-активностью ( $r=0,93$ ,  $p<0,05$ ). У пациентов с ХОБЛ эластазная активность IgA коррелирует с аналогичной активностью IgM ( $r=0,82$ ,  $p<0,05$ ).

Интересно отметить, что индуцированное ловушкообразование коррелирует с пероксидазной активностью иммуноглобулинов класса М пациентов с бронхиальной астмой ( $r=0,85$ ,  $p<0,05$ ).

В настоящее время известно о большом разнообразии типов антител: антигенспецифических, природных, полиреактивных, широко нейтрализующих, гомофильных, биспецифических, каталитических и т. д. Каталитические антитела являются важным компонентом этого репертуара [23]. Исследование абзимной активности иммуноглобулинов А и М при БА и ХОБЛ проведено впервые. Кроме эластазной, каталазной и пероксидазной (только при БА) активности у пациентов с хроническими обструктивными заболеваниями, нами впервые установлено, что иммуноглобулины М и А способны тормозить спонтанный распад субстрата дипептидилпептидазы-4.

Полученные пилотные результаты обосновывают дальнейшее комплексное изучение данных аспектов врожденного иммунитета с последующим их сравнением с клинико-лабораторными показателями течения БА и ХОБЛ.

## Литература

1. Amulic B., Cazalet S., Hayes G. et al. Neutrophil function: from mechanisms to disease. Annual Review of Immunology. 2012; Vol. 30: 459–489. DOI: 10.1146/annurev-immunol-020711-074942.
2. Yang H., Biermann M.H., Liu Y. et al. New Insights into Neutrophil Extracellular Traps: Mechanisms of Formation and Role in Inflammation. Front. Immunol., 2016; 7: 302 DOI: 10.3389/fimmu.2016.00302
3. Brinkmann V., Reichard U., Zychlinsky A. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science. 2004; Vol. 303: 1532–1535. DOI: 10.1126/science.1092385.
4. Uddin M., Watz H. NETopathic Inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Severe Asthma. Front. Immunol., 2019; 10: 47 DOI: 10.3389/fimmu.2019.00047
5. Arcanjo A., Logullo J., Morrot A. et al. The emerging role of neutrophil extracellular traps in severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (COVID-19) Sci Rep. 2020; 10: 19630. DOI: 10.1038/s41598-020-76781-0.
6. Krishnamoorthy N., Douda D., Bruggeman T. et al. Neutrophil cytoplasmic induce T H 17 differentiation and skew

## Выводы

1. Установлено, что предложенный нами метод оценки ловушкообразования позволяет равнозначно выявить НВЛ с использованием как световой, так и флуоресцентной микроскопии. Показатели спонтанного и индуцированного нетоза у пациентов с ХОБЛ составили 1,5% и 19% против 4% и 13% в группе БА.
2. Обнаружено достоверное повышение пероксидазной активности иммуноглобулинов класса А у пациентов с БА относительно пациентов с ХОБЛ. Выявлено достоверное повышение суммарной каталазной активности иммуноглобулинов классов А и М у пациентов с ХОБЛ относительно пациентов с БА. Отмечена способность иммуноглобулинов обоих классов как усиливать, так и предотвращать распад субстрата дипептидилпептидазы-4. При этом суммарный ингибирующий эффект иммуноглобулинов обоих классов относительно субстрата дипептидилпептидазы-4 был достоверно более выражен у пациентов с БА.
3. Показано, что иммуноглобулины класса А части пациентов с бронхиальной астмой проявляют гиалуронидазную активность. Установлено минимальное фоновое увеличение эластазной активности иммуноглобулинов классов А и М в обеих группах.

Исследование проводилось при финансовой поддержке БРФФИ, договор №20М-046. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов. Авторы декларируют отсутствие идентифицируемых пациентов в данном исследовании.

inflammation toward neutrophilia in severe asthma. Science immunology. 2018; Vol. 3(26): 4747. DOI: 10.1126/sciimmunol.aao4747.

7. Triverdi A., Khan M. Orchestration of Neutrophil Extracellular Traps (Nets), a Unique Innate Immune Function during Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) Development. Biomedicines. 2021 Jan; 9(1): 53. DOI: 10.3390/biomedicines9010053.

8. Almyroudis N., Grimm M. NETosis and NADPH oxidase: at the intersection of host defense, inflammation, and injury, Front Immunol. 2013 Mar 1; 4:45. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00045.

9. Сучков С.В., Алекберова З.С., Палеев Ф.Н. и др. Достижения и перспективы клинической абзимологии. Вестник РАМН. 2005; №9: 38–43.

10. Planque S., Mitsuda Yu., Taguchi H. et al. Characterization of gp120 hydrolysis by IgA antibodies from humans without HIV infection. AIDS Research and Human Retroviruses 2007; Vol. 23, №12: 1541–1553.

11. Katsutoshi O., Yasuo U., Kei-ichi S. et al. The Catalytic Activities of IgG and IgM Monoclonal Antibodies for the

Hydrolysis of p-Nitrophenyl Acetate, *Chemistry Letters* 1993; Vol.22, №6:1075-1078.

12. Planque S., Nishiyama Y., Sonoda S. et al. Physiological IgM Class Catalytic Antibodies Selective for Transthyretin Amyloid. *J Biol Chem.* 2014 May 9; 289(19): 13243–13258. DOI: 10.1074/jbc.M114.557231.

13. Bichara C., Amoras E., Vaz., G. et al. Persistence of Anti-SARS-CoV-2 IgM Antibody up to 8 Months Post-COVID-19 Case Reports in Clinical Medicine September 2021; Vol.10, №9. DOI: 10.4236/crcm.2021.109029.

14. Agusti A., Beasley R., Chen R. et al. Pocket guide to COPD diagnosis, management, and prevention. A Guide for Health Care Professionals. 2020 Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, Inc.

15. Генералов С.И., Ищенко О.В. Метод определения нейтрофилов и нейтрофильных внеклеточных ловушек в биологических жидкостях с помощью двойного окрашивания. *Имунопатология, аллергология, инфектология* 2020; №3: 21-29. DOI: 10.14427/jirai.2020.3.21.

16. Генералов И.И., Коротина О.Л., Жерулик С.В. Методы определения и виды каталитической активности поликлональных иммуноглобулинов класса А. *Имунопатология, аллергология, инфектология.* 2015; №1: 6-17.

17. Kundxer A., Volkova M., Dimitros P. et al. Deoxyribonuclease activity of polyclonal IgGs: a putative serological marker in patients with spondyloarthritis. *Immunologic Research* Jul 2011; V. 56, №3: 457-464. DOI:10.1007/s12026-013-8424-9.

18. Бедина С.А., Мозговая Е.Э. Образование внеклеточных ловушек нейтрофилами и моноцитами периферической крови больных ревматоидным артритом: изучение нового цитруллинсодержащего аутоантигена. *Медицинская иммунология* 2021; 23(5):1165-1170. DOI: 10.15789/1563-0625-FOE-2301.

19. Wright T.K., Gibson P.G., Simpson J.L. et al. Neutrophil Extracellular Traps Are Associated with Inflammation in Chronic Airway Disease. *Respirol. Carlton Vic.* 2016; 21:467–475. DOI: 10.1111/resp.12730.

20. Papayannopoulos V., Metzler K.D., Hakkim A. et al. Neutrophil Elastase and Myeloperoxidase Regulate the Formation of Neutrophil Extracellular Traps. *J. Cell Biol.* 2010; 191:677–691. DOI: 10.1083/jcb.201006052.

21. Dicker A.J., Crichton M.L., Pumphrey E.G. et al. Neutrophil Extracellular Traps Are Associated with Disease Severity and Microbiota Diversity in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2018; 141:117–127. DOI: 10.1016/j.jaci.2017.04.022.

22. Sohal S.S. Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) and Lung Cancer: Epithelial Mesenchymal Transition (EMT). *EBioMedicine.* 2015; 2:1578–1579. DOI: 10.1016/j.ebiom.2015.10.016.

23. Ermakov E.A., Nevinsky G.A., Buneva V.N. Immunoglobulins with Non-Canonical Functions in Inflammatory and Autoimmune Disease States. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(15):5392. Published 2020 Jul 29. DOI:10.3390/ijms21155392.

#### Сведения об авторах

Генералов Сергей Игоревич – аспирант кафедры клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК ВГМУ. 210009, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, ВГМУ. Sig752@mail.ru, тел. +375333926628.

Ищенко Оксана Владимировна – д.м.н., заведующий кафедрой клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК ВГМУ. oksana\_js200272@mail.ru, тел. +375257637971.

Сушкова Светлана Александровна – студентка 5 курса лечебного факультета ВГМУ.

Генералов Игорь Иванович – д.м.н., заведующий кафедрой клинической микробиологии ВГМУ. g2@tut.by, тел. +375257637971.

Поступила 23.12.2021 г.