

# Нетоз в патогенезе антифосфолипидного синдрома и системной красной волчанки

Нурбаева К.С.<sup>1</sup>, Решетняк Т.М.<sup>1,2</sup>, Лиля А.М.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой», Москва;

<sup>2</sup>кафедра ревматологии ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, Москва

<sup>1</sup>Россия, 115522, Москва, Каширское шоссе, 34А; <sup>2</sup>Россия, 125993, Москва, ул. Баррикадная, 2/1, стр. 1

Антифосфолипидный синдром (АФС) и системная красная волчанка (СКВ) являются аутоиммунными заболеваниями. В последние годы АФС рассматривается как аутоиммунное тромбовоспалительное заболевание. Установлено, что клинические проявления АФС могут персистировать, прогрессировать со временем или дебютировать на фоне адекватной антикоагулянтной терапии и в некоторых случаях требуют назначения иммуносупрессивных препаратов, что указывает на роль аутоиммунного воспаления в их развитии. Образование внеклеточных нейтрофильных ловушек (neutrophil extracellular traps, NETs) является одним из связующих звеньев воспаления и тромбоза. Нетоз представляет собой процесс, при котором активированные нейтрофилы во внеклеточном пространстве формируют «сетеподобные» структуры (NETs). В данном обзоре рассмотрена роль нейтрофилов и нетоза в патогенезе АФС и СКВ.

**Ключевые слова:** нетоз; внеклеточные нейтрофильные ловушки; тромбовоспаление; антифосфолипидный синдром; системная красная волчанка.

**Контакты:** Татьяна Магомедалиевна Решетняк; [treshetnyak@yahoo.com](mailto:treshetnyak@yahoo.com)

**Для ссылки:** Нурбаева КС, Решетняк ТМ, Лиля АМ. Нетоз в патогенезе антифосфолипидного синдрома и системной красной волчанки. Современная ревматология. 2021;15(5):96–102. DOI: 10.14412/1996-7012-2021-5-96-102

## *Netosis in the pathogenesis of antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus*

*Nurbaeva K.S.<sup>1</sup>, Reshetnyak T.M.<sup>1,2</sup>, Lila A.M.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow;

<sup>2</sup>Department of Rheumatology, Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Moscow

<sup>1</sup>34A, Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia; <sup>2</sup>2/1, Barrikadnaya Street, Build. 1, Moscow 125993, Russia

Antiphospholipid syndrome (APS) and systemic lupus erythematosus (SLE) are autoimmune diseases. In recent years, APS has been considered as an autoimmune thrombo-inflammatory disease. It has been established that clinical manifestations of APS can persist, progress over time, or debut during an adequate anticoagulant therapy and, in some cases, require administration of immunosuppressive drugs, which indicates the role of autoimmune inflammation in their development. The formation of extracellular neutrophil traps (neutrophil extracellular traps, NETs) is one of the connecting links of inflammation and thrombosis. Netosis is the process by which activated neutrophils in the extracellular space form netlike structures (NETs). This review examines the role of neutrophils and netosis in the pathogenesis of APS and SLE.

**Key words:** netosis; extracellular neutrophil traps; thrombus inflammation; antiphospholipid syndrome; systemic lupus erythematosus.

**Contact:** Tatiana Magomedalieva Reshetnyak; [treshetnyak@yahoo.com](mailto:treshetnyak@yahoo.com)

**For reference:** Nurbaeva KS, Reshetnyak TM, Lila AM. Netosis in the pathogenesis of antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus. *Sovremennaya Revmatologiya=Modern Rheumatology Journal*. 2021;15(5):96–102. DOI: 10.14412/1996-7012-2021-5-96-102

Антифосфолипидный синдром (АФС) — приобретенная аутоиммунная тромбофилия, характеризующаяся рецидивирующими тромбозами сосудов любого калибра и локализацией и/или акушерской патологией и обязательным выявлением стойко позитивных антифосфолипидных антител (аФЛ) [1]. К классическим серологическим маркерам АФС относят: антитела к кардиолипину (IgG-, IgM-аКЛ), антитела к  $\beta_2$ -гликопротеину 1 (IgG-, IgM-анти- $\beta_2$ ГП<sub>1</sub>) и волчаночный антикоагулянт. Наличие в крови всех трех видов антител обозначается как тройная позитивность по аФЛ. Наиболее часто АФС сочетается с системной красной волчан-

кой (СКВ) [2]. СКВ — системное аутоиммунное заболевание неизвестной этиологии, для которого характерна гиперпродукция аутоантител к различным компонентам ядра собственных клеток с развитием иммуновоспалительного повреждения тканей [3]. У 30–50% больных СКВ выявляются аФЛ, при этом только у трети из них развиваются тромбозы в рамках вторичного АФС [4, 5]. СКВ является независимым фактором риска развития тромбозов, а частота тромботических осложнений при данном заболевании, даже в отсутствие аФЛ, выше, чем в среднем в популяции, и может составлять до 40%, что указывает на роль других механиз-

мов в развитии окклюзии сосудов при СКВ [6, 7]. Важно отметить, что тромбозы считаются одной из ведущих причин смерти больных СКВ [8].

Механизм развития СКВ и АФС сложен и до конца не изучен, но частое сочетание этих заболеваний позволяет предположить наличие у них общих патогенетических звеньев [9]. В 2013 г. В. Engelmann и S. Massberg [10] ввели термин «иммуотромбоз» для обозначения сложного патологического процесса, который возникает в результате взаимодействия иммунного ответа и системы гемостаза. В настоящее время активно изучаются медиаторы иммуотромбоза (или тромбовоспаления) и подходы к терапии данного состояния. Особенно актуальным это стало во время пандемии новой коронавирусной инфекции (COVID-19), так как тромботические осложнения являются ее характерной особенностью и одной из основных причин летальных исходов [11]. АФС и СКВ можно отнести к классическим моделям, которые можно использовать для изучения хронической тромбовоспалительной патологии [11].

В последние годы АФС рассматривается не только как коагулопатия, но и как системное аутоиммунное воспалительное заболевание [12]. Помимо тромботических проявлений выделяют некритериальные признаки АФС, связанные с аФЛ, в том числе встречающиеся у больных СКВ без аФЛ [13, 14]. Данные проявления могут персистировать, прогрессировать со временем или дебютировать на фоне адекватной антикоагулянтной терапии, что в некоторых случаях требует назначения иммуносупрессивной терапии и указывает на роль аутоиммунного воспаления в их развитии [15].

Принимая во внимание социальное бремя тромбозов, вызванных АФС и СКВ, частое отсутствие адекватных результатов лечения и вследствие этого высокую частоту рецидивов тромбозов (несмотря на применение антикоагулянтов), а также тяжелые нетромботические проявления АФС и СКВ, актуальным является изучение механизмов развития этих заболеваний и поиск мишеней для лекарственной терапии. В обзоре рассмотрена роль нейтрофилов и процесса нетоза в патогенезе АФС и СКВ.

Ключевую роль в патогенезе СКВ отводят потере толерантности к собственным антигенам и нарушению активации Т- и В-лимфоцитов с последующей неконтролируемой гиперпродукцией аутоантител к компонентам ядра собственных клеток с отложением иммунных комплексов в различных тканях и развитием их функциональной недостаточности [3]. Среди клинических проявлений АФС главное место занимают тромбозы, связанные с наличием аФЛ. Эти антитела способны воздействовать на большинство процессов регуляции гемостаза, что в итоге приводит к гиперкоагуляции и дисфункции эндотелия. Однако для развития тромбозов недостаточно синтеза только аФЛ. Это послужило основанием для формулирования гипотезы двойного удара (two-hit hypothesis), согласно которой аФЛ (*первый удар*) создают условия для гиперкоагуляции, а формирование тромба индуцируют дополнительные факторы (*второй удар*), усиливающие активацию каскада свертывания крови, уже вызванную аФЛ. Хорошо известна роль тромбоцитов, моноцитов и эндотелиальных клеток в патогенезе АФС [13, 15].

В последние годы накапливается все больше данных об участии нейтрофилов в развитии клинического симпто-

комплекса АФС и СКВ. Нейтрофилы – самая многочисленная субпопуляция лейкоцитов, которая играет главную роль на первых этапах развития воспаления в ответ на повреждение тканей. Долгое время нейтрофилы считали гомогенной популяцией, но в последние годы их начали классифицировать в зависимости от плотности, экспрессии поверхностных маркеров и стадии созревания [16]. Важным шагом в понимании функциональной активности нейтрофилов стало их деление на нейтрофилы высокой (HDNs – High density neutrophils) и низкой (LDNs – Low density neutrophils) плотности, так как уровень последних наиболее часто повышен при патологических состояниях, связанных с воспалением [17].

Сегодня известно, что защитная функция нейтрофилов осуществляется тремя основными механизмами, из которых наиболее изученными являются фагоцитоз с деградацией чужеродного материала внутри фаголизосомы и выделение антимикробных пептидов во внеклеточную среду. В 2004 г. V. Brinkmann и соавт. [18] описали *принципиально новый механизм антимикробной защиты – образование внеклеточных нейтрофильных ловушек (neutrophil extracellular traps, NETs). Нетоз – процесс, при котором активированные нейтрофилы во внеклеточном пространстве формируют «сетеподобные» структуры (NETs)*. NETs состоят из модифицированного хроматина и белков цитоплазмы, ядра, гранул нейтрофилов, обладающих антимикробной активностью [19]. Нетоз может запускаться не только микроорганизмами, но и тромбоцитами, иммунными комплексами, белками системы комплемента, провоспалительными цитокинами, хемокинами, микрокристаллами, холестерином и др. [19].

Выделяют две модели формирования NETs. *Первая модель – суицидальный нетоз*, который является одной из форм запрограммированной клеточной гибели и зависит от фермента NADPH-оксидазы (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase – никотинамидадениндинуклеотидфосфат оксидаза). При воздействии внешнего стимула происходит активация NADPH-оксидазы с последующим образованием активных форм кислорода (АФК). АФК способствуют выходу сериновых протеаз из гранул в цитоплазму и ядро. В ядре они расщепляют гистоны, способствуя деконденсации хроматина. Из цитоплазмы в ядро также поступает PAD4 (peptidyl arginine deiminase 4 – пептидиларгининдезаминаза 4), которая обеспечивает цитруллинирование гистонов, что приводит к ослаблению связи гистонов с хроматином и его последующей деконденсации. Далее ядерная мембрана фрагментируется, и деконденсированный хроматин вместе с цитруллинированными гистонами выходят в цитоплазму. Впоследствии нарушается целостность плазматической мембраны, хроматин ядра и содержимое гранул нейтрофила выбрасываются во внеклеточное пространство.

*Альтернативный механизм формирования NETs – витальный нетоз*, при котором не происходит гибели нейтрофилов. Нейтрофил, не разрушая ядро, секреторирует везикулы, содержащие деконденсированный хроматин и гистоны, в межклеточную среду, в которой формируется сеть. Независимо от способа образования, NETs – это структуры, которые способны предотвращать диссеминацию микроорганизмов и в последующем инактивировать их [20]. Кроме участия во врожденном иммунном ответе, нейтрофилы и NETs также взаимодействуют с адаптивной (приоб-

ретенной) иммунной системой. Было показано, что нейтрофилы способны выступать в качестве антигенпрезентирующих клеток и регулировать активность Т-лимфоцитов. За счет синтеза BAFF (B-cell activating factor – В-клеточный активирующий фактор) и APRIL (a Proliferation-inducing ligand – лиганд, индуцирующий пролиферацию) нейтрофилы играют важную роль в созревании и выживаемости В-лимфоцитов [21], а непосредственно NETs снижают порог активации Т-лимфоцитов [22]. Т-клетки в присутствии NETs начинают пролиферировать даже при низких концентрациях антигена и отсутствии костимуляции [22].

Несомненно, важной ролью нейтрофилов и процесса нетоза является защита организма от инфекционных агентов. В то же время их избыточная или патологическая активация приводит к развитию и поддержанию аутоиммунного воспаления, злокачественных новообразований и тромбозов [23].

Установлено, что при СКВ возникает ряд структурных и функциональных нарушений нейтрофилов [24]. Для СКВ характерно повышение уровня субпопуляции LDNs. Это незрелая патологическая группа нейтрофилов, которая впервые была описана у больных СКВ и практически не выявляется у здоровых людей [25]. По сравнению с HDNs (или нейтрофилами нормальной плотности) LDNs более склонны к синтезу провоспалительных цитокинов, в первую очередь интерферона (ИФН) 1-го типа и фактора некроза опухоли  $\alpha$  [26]. Кроме того, в отличие от «нормальных» нейтрофилов, у LDNs снижена способность к фагоцитозу и усилена способность к спонтанному высвобождению NETs [27]. LDNs участвуют в создании патогенетически значимого иммуновоспалительного круга, в котором ИФН 1-го типа способствуют образованию NETs нейтрофилами, а NETs стимулируют синтез ИФН 1-го типа плазматоцитными дендритными клетками, что замыкает порочный круг воспаления [28, 29]. Система комплемента, которая играет большую роль в патогенезе СКВ и АФС, также способствуют формированию NETs, а компоненты NETs активируют систему комплемента [30]. Кроме повышенной способности к формированию NETs, у пациентов с СКВ нарушены процессы их деградации, что ассоциируется с активностью заболевания и уровнями аутоантител [31, 32]. Так, в исследовании J. Leffler и соавт. [32], при СКВ в 41% случаев выявлялись нарушения элиминации NETs. Изменение деградации NETs у данной когорты больных было ассоциировано с активным волчаночным нефритом, высокими уровнями антител к двуспиральной ДНК (анти-dsДНК) и гистонам. Среди вероятных причин нарушения расщепления NETs у больных СКВ рассматриваются увеличение количества ингибитора ДНКазы 1, а также выработка антител к NETs, которые препятствуют присоединению ДНКазы 1 к сетям NETs [32]. Неспособность удалять аутоантигены, такие как ДНК, гистоны, белки гранул, присутствующие в NETs, ведет к продолжительной стимуляции иммунных клеток и образованию аутореактивных клеток, в то же время NETs поддерживают гиперкоагуляцию [33].

Первое упоминание о роли нейтрофилов в развитии тромбозов появилось в 1971 г. в работе R.G. Lerner и соавт. [34]. Однако активное изучение вклада нейтрофилов в патогенез тромботических осложнений началось гораздо позже. В 2009 г. J. Hirahashi и соавт. [35] на мышинной модели тромботического гломерулонефрита показали, что нейтрофилы

являются неотъемлемой частью развития иммуноопосредованного тромбоза. При деплеции нейтрофилов или при дефиците интегрина Mac-1 (Macrophage-1 antigen – антиген макрофага 1), необходимого для привлечения нейтрофилов, тромбоз капилляров клубочков и острая почечная недостаточность возникали значительно реже, несмотря на устойчивую выработку провоспалительных цитокинов. В 2010 г. T.A. Fuchs и соавт. [36] впервые обнаружили, что NETs представляют собой важное связующее звено между воспалением и тромбозом. Они продемонстрировали, что NETs служат «платформой» для будущего тромба, а компоненты нейтрофильной внеклеточной ловушки способствуют адгезии, активации и агрегации тромбоцитов. Позже было отмечено, что NETs активируют фактор XII с последующей индукцией внутреннего пути свертывания крови, а за счет экспрессии тканевого фактора запускают внешний путь коагуляции под действием определенных триггеров [30, 37, 38]. Было установлено, что отдельные компоненты NETs, например гистоны, способны повышать уровень тромбина за счет стимулирования его аутоактивации [39] и ингибирования антитромбин-индуцированной инактивации тромбина [40], тогда как сериновые протеазы NETs, в первую очередь эластаза и катепсин G, содействуют разрушению антикоагулянтного фактора TFPi (Tissue factor pathway inhibitor – ингибитор пути тканевого фактора). Помимо этого, нейтрофильная эластаза способна разрушать антитромбин, что в итоге приводит к гиперкоагуляции [41].

Другой механизм гиперкоагуляции, опосредованный нейтрофилами и NETs, связан с системой комплемента – важным звеном врожденного иммунитета, неконтролируемая активация которого может привести к развитию тромбозов [30]. Первые сведения о связи NETs и системы комплемента были получены на мышах с нокаутом гена, кодирующего компонент комплемента C3, в связи с чем у данной группы мышей не формировались NETs. При введении нокаутным моделям C3-содержащей сыворотки здоровых мышей у них восстанавливалась способность к нетозу [30]. Позднее в других исследованиях было показано, что белки системы комплемента индуцируют формирование NETs, а они, в свою очередь, способны активировать систему комплемента, что замыкает порочный круг воспаления и гиперкоагуляции [42, 43].

Нарушение нетоза и его связь с тромбозом были обнаружены при различных патологических состояниях: инфаркте миокарда, остром нарушении мозгового кровообращения, обширных травмах, злокачественных новообразованиях, тромботических микроангиопатиях, аутоиммунных ревматических заболеваниях, сепсисе и COVID-19 [44–46].

В последнее время накоплено достаточное количество данных, указывающих на важную роль нетоза и нейтрофилов в патогенезе АФС. Впервые участие NETs в патогенезе АФС было продемонстрировано в 2015 г. S. Yalavarthi и соавт. [47]. Было показано статистически значимое повышение уровней маркеров NETs: комплекса миелопероксидаза – ДНК (МПО – ДНК) и свободно циркулирующей ДНК в сыворотке крови больных первичным АФС без активных тромбозов на момент исследования по сравнению со здоровой контрольной группой. Отмечена положительная связь между уровнем анти- $\beta$ ГП1-IgG, положительным ВА и комплексом МПО – ДНК. Было установлено, что у пациентов с тройной позитивностью по аФЛ уровень МПО – ДНК вы-

ше ( $p < 0,05$ ), чем у пациентов с позитивностью только по аФЛ (один из классических серологических маркеров АФС). Результаты исследования показали, что нейтрофилы больных АФС более склонны к спонтанному нетозу по сравнению с контролем *in vitro*, а уровень NETs *in vitro* связан с уровнем комплекса МПО – ДНК *in vivo*. При добавлении сыворотки больных АФС к нейтрофилам группы сравнения отмечалось повышение высвобождения ими NETs. Это позволило предположить, что аФЛ способствуют индукции нетоза. Кроме того, было обнаружено, что  $\beta_2$ ГП<sub>1</sub> экспрессируется на поверхности нейтрофилов и его связывание с анти- $\beta_2$ ГП<sub>1</sub> может активировать нейтрофилы и процесс нетоза. Другое интересное наблюдение заключалось в том, что для высвобождения аФЛ-опосредованных NETs требовались как образование АФК, так и участие TLR4 (Toll-like receptor 4 – мембранный белок, относящийся к группе толл-подобных рецепторов). Также установлена связь между концентрацией свободно циркулирующей ДНК (маркер NETs) и артериальными тромбозами в анамнезе ( $p = 0,04$ ). Кроме того, было показано, что аФЛ-стимулированные NETs обладают протромбогенным потенциалом за счет увеличения образования протромбина, данный эффект блокировался введением ДНКазы I.

Исследования на мышиных моделях доказали роль IgG-аФЛ в образовании тромбов [48]. При инъекции через нижнюю полую вену (модель венозных тромбозов) мышам со сниженным кровотоком IgG-аФЛ больных АФС с тройной позитивностью размеры тромбов были значимо больше, чем у контрольных животных, которым вводили IgG здоровых доноров (оценка через 48 ч после наложения лигатуры для снижения кровотока). При исследовании самих тромбов было выявлено статически значимое повышение уровня маркера NETs – цитруллинированного гистона H<sub>3</sub> – у мышей с аФЛ по сравнению с показателями контрольной группы, что позволило предположить, что IgG-аФЛ стимулируют нетоз с последующим тромбообразованием. Через 6 ч после выполнения операции тромбы в системе нижней полую вены выявлялись у 100% мышей со сниженным кровотоком и с IgG-аФЛ, а в контрольной группе – у 50%. При введении ДНКазы I, которая разрушала NETs, или при децелляции нейтрофилов частота тромбозов у мышей с аФЛ снижалась до уровня контрольной группы [48].

Роль комплекса анти- $\beta_2$ ГП<sub>1</sub>/ $\beta_2$ ГП<sub>1</sub> в формировании NETs и их способности активировать тромбоциты была продемонстрирована в исследовании С. Zha и соавт. [49]. Авторы обнаружили, что комплекс анти- $\beta_2$ ГП<sub>1</sub>/ $\beta_2$ ГП<sub>1</sub> индуцирует формирование NETs, которое зависит от активации оси: TLR4 – MyD88 (Myeloid differentiation factor 88 – фактор 88 миелоидной дифференцировки) – IRAKs (IL-1 Receptor-associated kinases – интерлейкин 1-рецептор-ассоциированная киназа) – MAPKs (Mitogen-activated protein kinases – митоген-активируемая протеинкиназа) – АФК. Нетоз нарушался при использовании ингибиторов данных молекул. Кроме того, было установлено, что анти- $\beta_2$ ГП<sub>1</sub>/ $\beta_2$ ГП<sub>1</sub> индуцируют экспрессию тканевого фактора NETs. Образованные нейтрофильные внеклеточные ловушки также способствовали активации и агрегации тромбоцитов *in vitro*. На модели железа хлорид (FeCl<sub>3</sub>)-индуцированного тромбоза сонной артерии *in vivo* введение анти- $\beta_2$ ГП<sub>1</sub>/ $\beta_2$ ГП<sub>1</sub> крысам значительно ускоряло окклюзию сонной артерии по сравнению с таковой в контрольной группе.

Использование ДНКазы I (вводимой за 30 мин до операции) значимо замедляло тромбообразование у крыс с анти- $\beta_2$ ГП<sub>1</sub>/ $\beta_2$ ГП<sub>1</sub> [49]. По данным Y. You и соавт. [50], также было выявлено значимое повышение высвобождения NETs нейтрофилами под действием анти- $\beta_2$ ГП<sub>1</sub>/ $\beta_2$ ГП<sub>1</sub> по сравнению с контролем и изолированным действием  $\beta_2$ ГП<sub>1</sub> или анти- $\beta_2$ ГП<sub>1</sub> ( $p < 0,001$ ).

Акушерская патология при АФС является результатом тромбоза сосудов плаценты на поздних сроках, а на ранних стадиях может развиваться по механизму иммуноопосредованного повреждения. Роль нейтрофилов в возникновении акушерской патологии при АФС продолжает изучаться. Y. Lu и соавт. [51] выявили в сыворотке крови у беременных с акушерским АФС без тромбозов в анамнезе более высокий уровень комплекса МПО – ДНК, МПО и нейтрофильной эластазы (маркеры NETs), чем у беременных без АФС ( $p < 0,05$ ). У женщин с АФС был значимо повышен уровень свободной ДНК. Учитывая, что источником ДНК также может быть плацента, авторы проанализировали связь между уровнем свободной циркулирующей ДНК и комплексом МПО – ДНК и установили, что отчасти ДНК была нейтрофильной. Исследователи определили, что нейтрофилы больных АФС более склонны к спонтанному нетозу по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ). Было показано, что при инкубации нейтрофилов здоровых женщин с IgG-аФЛ высвобождается больше свободной ДНК, чем при инкубации с IgG контрольной группы. Также было выявлено, что аФЛ индуцируют кислородозависимую активацию нетоза и играют роль в развитии плацентарной дисфункции [51]. Представляют интерес данные, свидетельствующие о том, что аФЛ-активированные NETs снижают инвазивную способность и миграционную активность трофобласта и оказывают негативное влияние на способность клеток эндотелия пупочной вены к миграции и образованию трубок, что подтверждает роль NETs в развитии плацентарной дисфункции у пациенток с АФС.

В настоящее время доказано участие генов ИНФ 1-го типа в механизме развития СКВ и возможность их использования в качестве терапевтической мишени, данные об АФС немногочисленны. M. van der Linden и соавт. [52] установили у здоровых добровольцев статистически значимое повышение высвобождения NETs нейтрофилами при добавлении к ним плазмы пациентов с АФС, СКВ и СКВ + АФС по сравнению с плазмой контрольной группы. Уровень NETs был связан с уровнем анти-dsДНК при СКВ и с уровнем антинуклеарных антител при АФС ( $p < 0,05$ ), но не с активностью заболеваний по шкале SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index) при СКВ с/без АФС и показателями шкалы aGAPSS (adjusted Global antiphospholipid syndrome Score – скорректированная глобальная оценка АФС) при АФС. В динамике после иммуносупрессивной терапии снижение уровня анти-dsДНК коррелировало со снижением уровня NETs. У больных СКВ с гиперэкспрессией генов семейства ИНФ 1-го типа (IFN-high) высвобождение NETs было выше, чем у больных с низкой экспрессией (IFN-low) интерферон-стимулированных генов ( $p < 0,01$ ). Также при высоком содержании ИФН обнаруживался значимо более высокий уровень циркулирующих LDNs, чем при их низком уровне ( $p < 0,01$ ). Интересно, что эти ассоциации не наблюдались у пациентов с АФС и СКВ + АФС ( $p > 0,05$ ). Данный факт позволил заключить, что уровни

NETs и LDNs повышены у больных АФС, независимо от интерферонового статуса и, вероятно, связаны с наличием антител к  $\beta_2$ ГП<sub>1</sub> [29].

Роль аутоантител к NETs и компонентам нейтрофилов в патогенезе СКВ и АФС недостаточно изучена, а иногда представляется противоречивой. Имеются данные, что при СКВ аутоантитела к NETs, препятствуют деградации нейтрофильных внеклеточных ловушек и способствуют поддержанию воспаления [32]. При АФС также было выявлено снижение деградации NETs по сравнению с таковой у здоровых добровольцев, но не столь значительное как при СКВ. Выявление антител к NETs и нейтрофилам у пациентов с АФС чаще всего ассоциировалось с наличием антинуклеарных антител и анти-dsДНК [53].

В исследовании Y. Zuo и соавт. [54] было показано, что у больных АФС выявлялись значимо более высокие уровни IgG- и IgM-анти-NETs по сравнению с контролем. Как и в других исследованиях [31, 32], антитела к NETs ассоциировались со снижением деградации NETs, но, кроме того, было отмечено, что именно высокий уровень IgG-анти-NETs связан с уменьшением элиминации NETs. Результаты данной работы позволили сделать заключение, что существует обратная связь между уровнем IgM-анти-NETs и уровнем компонента комплемента C4, что указывает на связь нетоза и системы комплемента. Интересно, что IgG-анти-NETs чаще выявлялись у пациентов с АФС и рецидивирующими венозными тромбозами в анамнезе, тогда как IgM-анти-NETs – с артериальными тромбозами [54].

При СКВ установлена связь между уровнями LDNs и NETs [25]. При АФС однозначных данных о такой связи нет. Так, S. Yalavarthi и соавт. [47] не выявили различий между уровнями LDNs у больных АФС и здоровых лиц. Напротив, в исследовании L.L. van den Hoogen и соавт. [55] было указано на значительное увеличение концентрации LDNs у пациентов с АФС, СКВ + АФС, СКВ с аФЛ по сравнению со здоровым контролем и больными СКВ без аФЛ. При АФС с IgG-анти- $\beta_2$ ГП<sub>1</sub> уровень LDNs был выше, чем при АФС без этих антител. В группе больных АФС разницы между уровнем LDNs и локализацией тромбоза не обнаружено.

L.M. Mauracher и соавт. [56] также отметили, что у пациентов с АФС уровень LDNs значимо выше, чем в контрольной группе, сопоставимой по возрасту и полу.

В экспериментах *in vitro* было обнаружено, что в условиях, характерных для венозного и артериального кровотока, нейтрофилы пациентов с АФС обладают повышенной адгезией к эндотелиальным клеткам по сравнению с нейтрофилами группы контроля. При исследовании экспрессии молекул адгезии было установлено, что нейтрофилы пациентов с АФС экспрессируют больше CD64 (Cluster of Differentiation 64), CEACAM1 [Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (biliary glycoprotein)] и активированного Mac-1 на своей поверхности по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ). При воздействии плазмы больных АФС на нейтрофилы здоровых добровольцев на них усиливалась экспрессия поверхностных маркеров и увеличивалась адгезия к эндотелию ( $p < 0,001$ ). Кроме того, авторами было показано, что Mac-1 необходим для аФЛ-опосредованного нетоза. При использовании моноклональных антител к активированному Mac-1 снижалась не только адгезия нейтрофилов больных АФС, но и в значительной степени нетоз [57]. При транскриптомном анализе нейтрофилов пациентов с АФС было обнаружено существенное увеличение экспрессии гена, кодирующего PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1 – гликопротеиновый лиганд Р-селектина 1, ключевой молекулы адгезии нейтрофилов), по сравнению с контролем. При ингибировании PSGL-1 или при его дефиците снижались нетоз и частота венозных тромбозов у мышей *in vivo* [58].

Таким образом, открытие образования нейтрофилами NETs обнаружило их неожиданные функции при воспалительных заболеваниях и патологии системы гемостаза. Проведенные исследования продемонстрировали важную роль нейтрофилов и NETs в качестве связующего звена между воспалением и развитием тромбозов у пациентов с АФС и СКВ. Перспективными являются их дальнейшее изучение и создание лекарственных препаратов, избирательно подавляющих патологически активные нейтрофилы и избыточную выработку ими NETs.

## Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Решетняк ТМ. Антифосфолипидный синдром: диагностика и клинические проявления (лекция). Научно-практическая ревматология. 2014;52(1):56-71. [Reshetnyak TM. Antiphospholipid syndrome: diagnosis and clinical manifestations (lecture). *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya*. 2014;52(1):56-71. (In Russ.)].
2. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost*. 2006 Feb;4(2):295-306. doi: 10.1111/j.1538-7836.2006.01753.x.
3. Насонов ЕЛ, редактор. Системная красная волчанка. В кн.: Российские клинические рекомендации. Ревматология. Москва: ГЭОТАР-Медиа; 2017. С. 113-41. [Nasonov EL, editor. Systemic lupus erythematosus. In: *Rossiiskie klinicheskie rekomendatsii*. *Revmatologiya* [Russian clinical guidelines. *Rheumatology*]. Moscow: GEOTAR-Media; 2017. P. 113-41].
4. Ünlü O, Zuilý S, Erkan D. The clinical significance of antiphospholipid antibodies in systemic lupus erythematosus. *Eur J Rheumatol*. 2016 Jun;3(2):75-84. doi: 10.5152/eurjrheum.2015.0085. Epub 2015 Dec 29.
5. Bazzan M, Vaccarino A, Marletto F. Systemic lupus erythematosus and thrombosis. *Thromb J*. 2015 Apr 23;13:16. doi: 10.1186/s12959-015-0043-3. eCollection 2015.
6. Hinojosa-Azaola A, Romero-Diaz J, Vargas-Ruiz AG, et al. Venous and Arterial Thrombotic Events in Systemic Lupus Erythematosus. *J Rheumatol*. 2016 Mar;43(3):576-86. doi: 10.3899/jrheum.150506
7. Al-Homood IA. Thrombosis in systemic lupus erythematosus: a review article. *ISRN Rheumatol*. 2012;2012:428269. doi: 10.5402/2012/428269. Epub 2012 Jul 30.
8. Cervera R, Serrano R, Pons-Estel GJ, et al. Euro-Phospholipid Project Group (European Forum on Antiphospholipid Antibodies). Morbidity and mortality in the antiphospholipid syndrome during a 10-year period: a multicentre prospective study of 1000 patients. *Ann Rheum Dis*. 2015 Jun;74(6):1011-8. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204838
9. Wirestam L, Arve S, Linge P, Bengtsson AA. Neutrophils-Important Communicators in Systemic Lupus Erythematosus and Antiphospholipid Syndrome. *Front Immunol*. 2019 Nov 22;10:2734. doi: 10.3389/fimmu.2019.02734. eCollection 2019.
10. Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as

- an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013 Jan;13(1):34-45. doi: 10.1038/nri3345. Epub 2012 Dec 7.
11. Насонов ЕЛ, Бекетова ТВ, Решетняк ТМ и др. Коронавирусная болезнь 2019 (COVID-19) и иммуновоспалительные ревматические заболевания: на перекрестке проблем тромбовоспаления и аутоиммунитета. Научно-практическая ревматология. 2020;58(4):353-67. [Nasonov EL, Beketova TV, Reshetnyak TM, et al. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) and immuno-inflammatory rheumatic diseases: at the intersection of thromboinflammation and autoimmunity problems. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya.* 2020;58(4):353-67. (In Russ.)].
12. Taraborelli M, Andreoli L, Tincani A. Much more than thrombosis and pregnancy loss: The antiphospholipid syndrome as a «systemic disease». *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2012 Feb;26(1):79-90. doi: 10.1016/j.berh.2012.01.006.
13. Yazici A. Definition and treatment approach of non-criteria clinical manifestations of antiphospholipid syndrome. *Eur J Rheumatol.* 2020;7(4):180-3. doi:10.5152/eurjrheum.2020.20099
14. Xourgia E, Tektonidou MG. Management of Non-criteria Manifestations in Antiphospholipid Syndrome. *Curr Rheumatol Rep.* 2020 Jul 22;22(9):51. doi: 10.1007/s11926-020-00935-2.
15. Решетняк ТМ, Чельдиева ФА, Нурбаева КС и др. Антифосфолипидный синдром: диагностика, механизм развития, вопросы терапии. Тромбоз, гемостаз и реология. 2020;(4):4-21. [Reshetnyak TM, Chel'dieva FA, Nurbaeva KS, et al. Antiphospholipid syndrome: diagnosis, mechanism of development, therapy issues. *Tromboz, gemostaz i reologiya.* 2020;(4):4-21. (In Russ.)].
16. Андрияков БГ, Богданова ВД, Ляпун ИН. Фенотипическая гетерогенность нейтрофилов: новые антимикробные характеристики и диагностические технологии. Гематология и трансфузиология. 2019; 64(2):211-21. [Andryukov BG, Bogdanova VD, Lyapun IN. Phenotypic heterogeneity of neutrophils: new antimicrobial characteristics and diagnostic technologies. *Gematologiya i transfuziologiya.* 2019;64(2):211-21. (In Russ.)].
17. Hassani M, Hellebrekers P, Chen N, et al. On the origin of low-density neutrophils. *J Leukoc Biol.* 2020 May;107(5):809-18. doi: 10.1002/JLB.5HR0120-459R. Epub 2020 Mar 14.
18. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004 Mar 5;303(5663):1532-5. doi: 10.1126/science.1092385.
19. Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J Immunol.* 2012 Sep 15;189(6):2689-95. doi: 10.4049/jimmunol.1201719.
20. Воробьева НВ. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: новые аспекты. Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. 2020;75(4):210-25. [Vorob'eva NV. Neutrophil extracellular traps: new aspects. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 16. Biologiya.* 2020;75(4):210-25. (In Russ.)].
21. Li Y, Wang W, Yang F, et al. The regulatory roles of neutrophils in adaptive immunity. *Cell Commun Signal.* 2019 Nov 14;17(1):147. doi: 10.1186/s12964-019-0471-y.
22. Minns D, Smith KJ, Findlay EG. Orchestration of Adaptive T Cell Responses by Neutrophil Granule Contents. *Mediators Inflamm.* 2019 Mar 10;2019:8968943. doi: 10.1155/2019/8968943. eCollection 2019.
23. Klopff J, Brostjan C, Eilenberg W, et al. Neutrophil Extracellular Traps and Their Implications in Cardiovascular and Inflammatory Disease. *Int J Mol Sci.* 2021 Jan 8;22(2):559. doi: 10.3390/ijms22020559.
24. Smith CK, Kaplan MJ. The role of neutrophils in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol.* 2015 Sep;27(5):448-53. doi: 10.1097/BOR.000000000000197.
25. Kaplan MJ. Neutrophils in the pathogenesis and manifestations of SLE. *Nat Rev Rheumatol.* 2011 Sep 27;7(12):691-9. doi: 10.1038/nrrheum.2011.132.
26. Tay SH, Celhar T, Fairhurst AM. Low-Density Neutrophils in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* 2020 Oct;72(10):1587-95. doi: 10.1002/art.41395. Epub 2020 Aug 26.
27. Rahman S, Sagar D, Hanna RN, et al. Low-density granulocytes activate T cells and demonstrate a non-suppressive role in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2019 Jul;78(7):957-66. doi: 10.1136/annrheumdis-2018-214620. Epub 2019 Apr 30.
28. Garcia-Romo GS, Caielli S, Vega B, et al. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med.* 2011 Mar 9;3(73):73ra20. doi: 10.1126/scitranslmed.3001201.
29. Van den Hoogen LL, van der Linden M, Meyaard L, et al. Neutrophil extracellular traps and low-density granulocytes are associated with the interferon signature in systemic lupus erythematosus, but not in antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2020 Oct;79(10):e135. doi: 10.1136/annrheumdis-2019-215781. Epub 2019 Jun 8.
30. De Bont CM, Boelens WC, Puijnt GJM. NETosis, complement, and coagulation: a triangular relationship. *Cell Mol Immunol.* 2019 Jan;16(1):19-27. doi: 10.1038/s41423-018-0024-0. Epub 2018 Mar 23.
31. Hakkim A, Fülcrand BG, Amann K, et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 May 25;107(21):9813-8. doi: 10.1073/pnas.0909927107. Epub 2010 May 3.
32. Leffler J, Gullstrand B, Jönsen A, et al. Degradation of neutrophil extracellular traps co-varies with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 2013 Aug 14;15(4):R84. doi: 10.1186/ar4264.
33. Salemme R, Peralta LN, Meka SH, et al. The Role of NETosis in Systemic Lupus Erythematosus. *J Cell Immunol.* 2019;1(2):33-42. doi: 10.33696/immunology.1.008. Epub 2019 Nov 12.
34. Lerner RG, Goldstein R, Cummings G, et al. Stimulation of human leukocyte thromboplastic activity by endotoxin. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1971 Oct;138(1):145-8. doi: 10.3181/00379727-138-35848
35. Hirahashi J, Hishikawa K, Kaname S, et al. Mac-1 (CD11b/CD18) links inflammation and thrombosis after glomerular injury. *Circulation.* 2009 Sep 29;120(13):1255-65. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.873695. Epub 2009 Sep 14.
36. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(36):15880-5. doi:10.1073/pnas.1005743107
37. Von Brühl ML, Stark K, Steinhilber A, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med.* 2012 Apr 9;209(4):819-35. doi: 10.1084/jem.20112322. Epub 2012 Mar 26.
38. Kambas K, Mitroulis I, Ritis K. The emerging role of neutrophils in thrombosis—the journey of TF through NETs. *Front Immunol.* 2012 Dec 18;3:385. doi: 10.3389/fimmu.2012.00385. eCollection 2012.
39. Barranco-Medina S, Pozzi N, Vogt AD, et al. Histone H4 promotes prothrombin autoactivation. *J Biol Chem.* 2013 Dec 13;288(50):35749-57. doi: 10.1074/jbc.M113.509786. Epub 2013 Oct 30.
40. Varjib I, Longstaff C, Szabo L, et al. DNA, histones and neutrophil extracellular traps exert anti-fibrinolytic effects in a plasma environment. *Thromb Haemost.* 2015 Jun;113(6):1289-98. doi: 10.1160/TH14-08-0669
41. Massberg S, Gahl L, von Bruehl ML, et al. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med.* 2010 Aug;16(8):887-96. doi: 10.1038/nm.2184. Epub 2010 Aug 1.
42. Zuo Y, Kanthi Y, Knight JS, et al. The interplay between neutrophils, complement, and microthrombi in COVID-19. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2021 Mar;35(1):101661. doi: 10.1016/j.berh.2021.101661. Epub 2021 Jan 13.
43. Yuen J, Pluthero FG, Douda DN, et al. Neutrophils Activate Complement Both on Their Own NETs and Bacteria via Alternative and Non-alternative Pathways. *Front Immunol.* 2016 Apr 14;7:137. doi: 10.3389/fimmu.2016.00137. eCollection 2016.
44. Thalin C, Hisada Y, Lundström S, et al. Neutrophil Extracellular Traps: Villains and

- Targets in Arterial, Venous, and Cancer-Associated Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019 Sep;39(9):1724-38. doi: 10.1161/ATVBAHA.119.312463. Epub 2019 Jul 18.
45. Laridan E, Martinod K, De Meyer SF. Neutrophil Extracellular Traps in Arterial and Venous Thrombosis. *Semin Thromb Hemost.* 2019 Feb;45(1):86-93. doi: 10.1055/s-0038-1677040
46. Skendros P, Mitsios A, Chrysanthopoulou A, et al. Complement and tissue factor-enriched neutrophil extracellular traps are key drivers in COVID-19 immunothrombosis. *J Clin Invest.* 2020 Nov 2;130(11):6151-7. doi: 10.1172/JCI141374
47. Yalavarthi S, Gould TJ, Rao AN, et al. Release of neutrophil extracellular traps by neutrophils stimulated with antiphospholipid antibodies: a newly identified mechanism of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheumatol.* 2015 Nov;67(11):2990-3003. doi: 10.1002/art.39247.
48. Meng H, Yalavarthi S, Kanthi Y, et al. In Vivo Role of Neutrophil Extracellular Traps in Antiphospholipid Antibody-Mediated Venous Thrombosis. *Arthritis Rheumatol.* 2017 Mar;69(3):655-67. doi: 10.1002/art.39938
49. Zha C, Zhang W, Gao F, et al. Anti- $\beta_2$ GPI/ $\beta_2$ GPI induces neutrophil extracellular traps formation to promote thrombogenesis via the TLR4/MyD88/MAPKs axis activation. *Neuropharmacology.* 2018 Aug;138:140-50. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.06.001
50. You Y, Liu Y, Li F, et al. Anti- $\beta_2$ GPI/ $\beta_2$ GPI induces human neutrophils to generate NETs by relying on ROS. *Cell Biochem Funct.* 2019 Mar;37(2):56-61. doi: 10.1002/cbf.3363. Epub 2019 Jan 30.
51. Lu Y, Dong Y, Zhang Y, et al. Antiphospholipid antibody-activated NETs exacerbate trophoblast and endothelial cell injury in obstetric antiphospholipid syndrome. *J Cell Mol Med.* 2020 Jun;24(12):6690-703. doi: 10.1111/jcmm.15321
52. Van der Linden M, van den Hoogen LL, Westeralaken GHA, et al. Neutrophil extracellular trap release is associated with antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus and anti-phospholipid syndrome. *Rheumatology (Oxford).* 2018 Jul 1;57(7):1228-34. doi: 10.1093/rheumatology/key067
53. Leffler J, Stojanovich L, Shoenfeld Y, et al. Degradation of neutrophil extracellular traps is decreased in patients with antiphospholipid syndrome. *Clin Exp Rheumatol.* Jan-Feb 2014;32(1):66-70. Epub 2013 Dec 2.
54. Zuo Y, Yalavarthi S, Gockman K, et al. Anti-Neutrophil Extracellular Trap Antibodies and Impaired Neutrophil Extracellular Trap Degradation in Antiphospholipid Syndrome. *Arthritis Rheumatol.* 2020 Dec;72(12):2130-5. doi: 10.1002/art.41460
55. Van den Hoogen LL, Fritsch-Stork RD, van Roon JA, Radstake TR. Low-Density Granulocytes Are Increased in Antiphospholipid Syndrome and Are Associated With Anti- $\beta_2$ -Glycoprotein I Antibodies: Comment on the Article by Yalavarthi et al. *Arthritis Rheumatol.* 2016 May;68(5):1320-1. doi: 10.1002/art.39576
56. Mauracher LM, Krall M, Roi $\beta$  J, et al. Neutrophil subpopulations and their activation potential in patients with antiphospholipid syndrome and healthy individuals. *Rheumatology (Oxford).* 2021 Apr 6;60(4):1687-99. doi: 10.1093/rheumatology/keaa532
57. Sule G, Kelley WJ, Gockman K, et al. Increased Adhesive Potential of Antiphospholipid Syndrome Neutrophils Mediated by  $\beta_2$  Integrin Mac-1. *Arthritis Rheumatol.* 2020 Jan;72(1):114-124. doi: 10.1002/art.41057.
58. Knight JS, Meng H, Coit P, et al. Activated signature of antiphospholipid syndrome neutrophils reveals potential therapeutic target. *JCI Insight.* 2017 Sep 21;2(18):e93897. doi: 10.1172/jci.insight.93897.

Поступила/отрецензирована/принята к печати  
Received/Reviewed/Accepted  
29.06.2021/12.08.2021/17.08.2021

#### Заявление о конфликте интересов/Conflict of Interest Statement

Статья подготовлена в рамках научной темы «Разработка методов персонализированной терапии ревматических заболеваний с коморбидной патологией» (AAAA-A19-119021190151-3).

Исследование не имело спонсорской поддержки. Конфликт интересов отсутствует. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать. Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами.

The investigation has been conducted within scientific topic №AAAA-A19-119021190151-3 «Development of methods for personalized therapy of rheumatic diseases with comorbid pathology».

The investigation has not been sponsored. There are no conflicts of interest. The authors are solely responsible for submitting the final version of the manuscript for publication. All the authors have participated in developing the concept of the article and in writing the manuscript. The final version of the manuscript has been approved by all the authors.

Нурбаева К.С. <https://orcid.org/0000-0001-6685-7670>  
Решетняк Т.М. <https://orcid.org/0000-0003-3552-2522>  
Лила А.М. <https://orcid.org/0000-0002-6068-3080>