Цитруллинированный гистон H3 при системной красной волчанке и антифосфолипидном синдроме (предварительные результаты)

Нурбаева К.С.[1,2], Решетняк Т.М.[1,2], Черкасова М.В.[1], Лила А.М.[1,2]

[1]ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой», Москва;
[2]кафедра ревматологии ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, Москва
[1]Россия, 115522, Москва, Каширское шоссе, 34А; [2]Россия, 125993, Москва, ул. Баррикадная, 2/1, стр.1

Цитруллинированный гистон H3 (CitH3) – специфический маркер нетоза, его роль в формировании клинико-лабораторных проявлений системной красной волчанки (СКВ) не установлена.

***Цель** исследования – оценить вклад CitH3 в развитие клинико-лабораторных проявлений СКВ с антифосфолипидным синдромом (АФС) и без него.*

***Материал и методы.** В исследование включено 30 пациентов СКВ и 39 с СКВ+АФС, в том числе 51 (73,9%) женщина и 18 (26,1%) мужчин. Медиана возраста больных – 36 [32; 46,5] лет. Контрольную группу составили 26 практически здоровых лиц.*

Активность СКВ оценивалась с помощью индекса SLEDAI-2K. Пациенты были разделены на две группы: 41 больной с умеренной и высокой активностью СКВ (SLEDAI-2K≥6) вошел в 1-ю группу, а 28 больных с низкой активностью или ремиссией (SLEDAI-2K <6) – во 2-ю.

Уровень CitH3 определяли в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа с набором реагентов для исследования CitH3 (BlueGene Biotech, Китай) согласно инструкции фирмы-изготовителя.

***Результаты и обсуждение.** Содержание CitH3 в сыворотке крови при СКВ было значимо выше, чем в контроле (p=0,048). Высокий уровень CitH3 в сыворотке крови ассоциировался с умеренной и высокой активностью СКВ (p=0,039). Концентрация CitH3 обратно коррелировала с числом лимфоцитов, но не была связана с иммунологическими показателями. Повышенный уровень CitH3 был связан с фотосенсибилизацией, сниженный – с серозитом в анамнезе. Значимых различий между уровнем CitH3 в сыворотке крови пациентов с СКВ и СКВ+АФС не выявлено (p=0,39).*

***Заключение.** Уровень специфического маркера нетоза CitH3 у пациентов с СКВ повышен, и это повышение ассоциировано с умеренной и высокой активностью болезни.*

***Ключевые слова:** нетоз; цитруллинированный гистон H3; системная красная волчанка.*
Контакты:** Татьяна Магомедалиевна Решетняк; **treshetnyak@yahoo.com
***Для ссылки:** Нурбаева КС, Решетняк ТМ, Черкасова МВ, Лила АМ. Цитруллинированный гистон H3 при системной красной волчанке и антифосфолипидном синдроме (предварительные результаты). Современная ревматология. 2023;17(4):19–27.*
***DOI:** 10.14412/1996-7012-2023-4-19-27*

Citrullinated histone H3 in systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome (preliminary results)

Nurbaeva K.S.[1,2], Reshetnyak T.M.[1,2], Cherkasova M.V.[1], Lila A.M.[1,2]

[1]V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow; [2]Department of Rheumatology Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Ministry of Health of Russia, Moscow
[1]34A, Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia; [2]2/1, Barrikadnaya Street, Build. 1, Moscow 125993, Russia

Citrullinated histone H3 (CitH3) is a specific marker for NETosis; its role in determining the clinical and laboratory manifestations of systemic lupus erythematosus (SLE) remains to be elucidated.

***Objective:** To evaluate the role of CitH3 in the development of clinical and laboratory manifestations in patients with SLE with and without antiphospholipid syndrome (APS).*

***Material and methods.** The study included 30 patients with SLE and 39 with SLE+APS, including 51 (73.9%) women and 18 (26.1%) men. The median age of the patients was 36 [32; 46.5] years. The control group consisted of 26 healthy individuals.*

SLE activity was assessed by the SLEDAI-2K index. Patients were divided into two groups: 41 patients with moderate and high SLE activity (SLEDAI-2K ≥6) were included in the first group, and 28 patients with low activity or remission (SLEDAI-2K <6) were included in the second group.

CitH3 content in blood serum was determined by enzyme immunoassay using a set of reagents for the assay of CitH3 (BlueGene Biotech, China) according to the manufacturer's instructions.

***Results and discussion.** CitH3 content in blood serum was significantly higher in SLE than in the control group (p=0.048). High blood serum CitH3 content was associated with moderate and high SLE activity (p=0.039). CitH3 concentration was inversely correlated with lymphocyte count but was not related to immunological parameters. Increased CitH3 levels were associated with photosensitivity, while lower levels were*

associated with a history of serositis. There were no significant differences between blood serum CitH3 levels in patients with SLE and SLE+APS (p=0.39).

Conclusion. *The concentration of a specific marker for NETosis, CitH3, is increased in patients with SLE, and this increase is associated with moderate and high disease activity.*

Keywords: *NETosis; citrullinated histone H3; systemic lupus erythematosus.*

Contact: *Tatyana Magomedalievna Reshetnyak;* ***treshetnyak@yahoo.com***

For reference: *Nurbaeva KS, Reshetnyak TM, Cherkasova MV, Lila AM. Citrullinated histone H3 in systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome (preliminary results). Sovremennaya Revmatologiya=Modern Rheumatology Journal. 2023;17(4):19–27.*

DOI: *10.14412/1996-7012-2023-4-19-27*

Системная красная волчанка (СКВ) – хроническое системное аутоиммунное ревматическое заболевание неясной этиологии, характеризующееся гиперпродукцией органонеспецифических аутоантител к различным компонентам ядра и цитоплазмы с развитием воспалительного повреждения органов и систем [1]. Патогенез СКВ сложен и включает нарушение различных звеньев иммунной системы [2]. В настоящее время особое внимание привлечено к изучению роли активации нейтрофилов и *нейтрофильных внеклеточных ловушек* (neutrophil extracellular traps, NETs) в развитии СКВ [3]. Нейтрофилы – клетки врожденной иммунной системы, которые осуществляют противомикробную защиту благодаря фагоцитозу, образованию активных форм кислорода, синтезу провоспалительных цитокинов и дегрануляции с высвобождением бактерицидных веществ [4]. В 2004 г. V. Brinkmann и соавт. [5] описали еще один защитный механизм, реализованный с участием нейтрофилов, – образование NETs в процессе нетоза. Нетоз представляет собой программу формирования активированными нейтрофилами сетеподобных структур – NETs, состоящих из деконденсированного хроматина, гранул белков и клеточного ядра. В их состав входят двуспиральная ДНК (дсДНК), цитруллинированные гистоны, миелопероксидаза (МПО) и другие белки, которые являются потенциальными аутоантигенами при аутоиммунных заболеваниях [6]. При СКВ NETs способны стимулировать синтез интерферона (ИНФ) I типа плазмацитоидными дендритными клетками и активировать систему комплемента [7].

Одним из ключевых этапов нетоза является деконденсация хроматина посредством цитруллинирования гистонов с помощью фермента пептидиларгининдеаминазы 4 (peptidylarginine deiminase 4, PAD4) [8]. *Цитруллинированный гистон H3* (citrullinated histone H3, CitH3) – специфический маркер образования NETs [9]. CitH3 отличается от нуклеосом свободно циркулирующей ДНК (сцДНК), которые часто используются как маркеры нетоза, но являются неспецифическими признаками, так как имеют много альтернативных источников образования, например в процессе апоптоза или некроза. CitH3 синтезируется преимущественно в ходе нетоза, что наряду с комплексом МПО-ДНК делает его наиболее специфичным биомаркером нетоза [10]. Вклад NETs в развитие СКВ и ее клинико-лабораторных проявлений продолжает обсуждаться.

Цель исследования – оценить роль CitH3 в развитии клинико-лабораторных проявлений СКВ с антифосфолипидным синдромом (АФС) и без него.

Материал и методы. В исследование включено 30 больных СКВ и 39 больных СКВ+АФС; 26 практически здоровых лиц составили контрольную группу.

Критерии включения: возраст старше 18 лет, подписанное информированное согласие пациента на участие в исследовании, достоверный диагноз СКВ.

Критерии невключения: острые инфекционные заболевания, COVID-19 в предшествующие 6 мес, онкологические заболевания в анамнезе, терминальные стадии печеночной, почечной, дыхательной недостаточности или тяжелая застойная сердечная недостаточность.

Характеристика пациентов и здоровых доноров представлена в табл. 1. Среди пациентов с СКВ преобладали женщины (p=0,030), больные СКВ имели меньшую продолжительность заболевания (p<0,0001) и были моложе пациентов с СКВ+АФС (p<0,001). Диагноз СКВ соответствовал классификационным критериям ACR (American College of Rheumatology) 1997 г. [11]; диагноз АФС – международным классификационным критериям 2006 г. [12]. Для оценки активности СКВ использовался индекс SLEDAI-2K (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index-2K) [13]: 0≤SLEDAI-2K≤5 соответствовал низкой, SLEDAI-2K≥6 – высокой активности СКВ. Для изучения необратимых повреждений органов применялся индекс повреждения (ИП) SLICC (Systemic Lupus International Collaborating Clinics) / ACR [14].

Клинико-лабораторная характеристика пациентов приведена в табл. 2.

Все пациенты, включенные в исследование, подписали информированное согласие на участие в нем. Все больные до включения в исследование проходили стандартное клинико-лабораторное и инструментальное обследование на базе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой».

Пациентам и здоровым донорам выполняли общий анализ крови с исследованием содержания лейкоцитов (норма 4,0–9,0·10^9/л), абсолютного числа нейтрофилов (норма 2,04–5,80·10^9/л), лимфоцитов (норма 1,20–3,00·10^9/л) с помощью автоматического гематологического анализатора XN 1000 (Sysmex, Япония). Иммунологический анализ включал определение антител к дсДНК (анти-дсДНК), Sm-антигену (aSm), IgG/IgM-антител к кардиолипину (аКЛ), IgG/IgM антител к β_2-гликопротеину 1 ($a\beta_2ГП_1$) методом иммуноферментного анализа (ИФА) на автоматическом анализаторе для лабораторной диагностики аутоиммунных заболеваний Alegria (Orgentec Diagnostika GmbH, Германия) с набором реагентов для выявления антител (Orgentec Diagnostika GmbH, Германия). В соответствии с данными производителя реагентов позитивными считали уровень анти-дсДНК >20 Ед/мл, aSm >25 Ед/мл, IgG аКЛ >25,0 GPL (IgG phospholipid binding unit – фосфолипидсвязывающая активность IgG аКЛ), IgM аКЛ>24,7 MPL (IgM phospholipid binding units – фосфолипидсвязывающая активность IgM аКЛ), IgG $a\beta_2ГП_1$ >15,3 Ед/мл и IgM $a\beta_2ГП_1$ >17,0

Таблица 1. Характеристика пациентов и здоровых доноров
Table 1. Characteristics of patients and healthy donors

Показатель	СКВ+АФС (n=39)	СКВ (n=30)	Контрольная группа (n=26)
Возраст, годы, Me [25-й; 75-й перцентили]	40 [34,5; 50]	34 [28; 39]	29 [25; 37]
Длительность заболевания, годы, Me [25-й; 75-й перцентили]	13 [6,5; 20,5]	4,8 [0,7; 11,1]	–
Пол: женщины/мужчины, n (%)	24 (62)/15 (39)	27 (90)/3 (10)	19 (73)/7 (27)

Таблица 2. Клинико-лабораторная характеристика пациентов
Table 2. Clinical and laboratory characteristics of patients

Показатель	СКВ+АФС (n=39)	СКВ (n=30)	Всего (n=69)
Эритема на лице, n (%)	18 (46)	16 (53)	34 (49)
Дискоидная сыпь, n (%)	0	2 (7)	2 (3)
Фотосенсибилизация, n (%)	8 (21)	12 (40)	20 (29)
Язвы ротовой полости, n (%)	6 (15)	8 (27)	14 (20)
Артрит, n (%)	23 (59)	19 (63)	42 (61)
Серозит, n (%)	19 (49)	21 (70)	40 (58)
Поражение почек, n (%)	18 (46)	16 (53)	34 (49)
Неврологические проявления, n (%)	6 (15)	3 (10)	9 (13)
Гематологические нарушения, n (%)	28 (72)	22(73)	50 (73)
Иммунологические нарушения, n (%)	39 (100)	30 (100)	69 (100)
Повышение титров АНФ, n (%)	39 (100)	30 (100)	69 (100)
Анти-дсДНК+, n (%)	38 (97)	25 (83)	63 (91)
SLEDAI-2K, Me [25-й; 75-й перцентили]	4 [2; 8]	14 [8; 19]	8 [4; 14]
ИП SLICC/ACR, Me [25-й; 75-й перцентили]	2 [2; 4]	0,5 [0; 1]	1 [0; 3]
Тромбоз в анамнезе, n (%)/число обследованных: всего артериальный венозный смешанный	 35 (90) 7 (20)/35 15 (43)/35 13 (37)/35	 8 (27) 3 (38)/8 5 (63)/8 0	 43 (62) 10 (14) 20 (29) 13 (19)
Акушерская патология*, n (%)/число беременностей	12/24	4/9	16 (23)
Акушерская патология, n: ≥3 выкидыша на сроке <10 нед выкидыш на сроке >10 нед преждевременные роды до 34 нед гестации из-за преэклапсии, эклампсии потеря беременности на ранних и поздних сроках гестации	 2 4 2 4	 1 0 2 1	 3 4 4 5
IgG-аКЛ+, n (%)	26 (67)	3 (10)/30	29 (42)
IgM-аКЛ+, n (%)	6 (15)	1 (3,3)	7 (10)
IgG-анти-β_2ГП$_1$+, n (%)	26 (67)	2 (6,6)	28 (41)
IgM-анти-β_2ГП$_1$+, n (%)	5 (13)	2 (6,6)	7 (10)
ВА+ в анамнезе, n (%)/число обследованных	23 (62)/37	0	23 (33)
Терапия**, n (%): ГК ГКХ БПВП, *в том числе:* ММФ	 34 (90) 29 (76) 6 (16) 5	 28 (93) 20 (67) 9 (30) 6	 62 (90) 49 (71) 15 (22) 11

Показатель	СКВ+АФС (n=39)	СКВ (n=30)	Всего (n=69)
ЦФ	0	2	2
АЗА	1	1	2
ГИБП (РТМ)	11 (29)	2 (7)	13 (23)
таргетный БПВП (барицитиниб)	–	2 (7)	2 (3)
антикоагулянты	28 (74)	8 (27)	36 (52)
антиагреганты	16 (42)	5 (17)	21 (30)
не получали лечение	3 (8)	2 (7)	5 (7)

Примечание. ГК – глюкокортикоиды; ГКХ – гидроксихлорохин; БПВП – базисные противовоспалительные препараты; ММФ – микофенолата мофетил; ЦФ – циклофосфамид; АЗА – азатиоприн; ГИБП – генно-инженерные биологические препараты; РТМ – ритуксимаб; * – учитывались беременность и акушерская патология за время заболевания; ** – терапия за последние 6 мес до момента забора крови.

Ед/мл [15]. Антинуклеарные антитела (АНА) определяли методом непрямой иммунофлюоресценции с использованием клеток Hep2 в качестве субстрата. Диагностическим, согласно рекомендациям производителя реагентов, считался уровень АНА >1/160. Концентрацию С3- и С4-компонентов комплемента оценивали с помощью метода иммунонефелометрии на анализаторе BN ProSpec (Siemens, Германия) с использованием наборов реагентов Siemens. В соответствии с данными производителя за сниженный уровень С3 принимались значения <0,900 г/л, С4 – значения <0,100 г/л. Исследование волчаночного антикоагулянта (ВА) проводилось у пациентов, не получавших антикоагулянты, на автоматическом коагулометре (Siemens Healthcare, Германия). Уровень CitH3 (нг/мл) определялся в сыворотке крови методом ИФА с набором реагентов производства (BlueGene Biotech, Китай) согласно инструкции фирмы-изготовителя.

Статистическая обработка данных выполнялась в программе IBM SPSS Statistics Version 26. Количественные переменные описывались в виде M±σ и медианы с интерквартильным интервалом (Me [25-й; 75-й перцентили]). Проверку нормальности распределения осуществляли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Количественные признаки сравнивались с использованием критерия Манна–Уитни. Для корреляционного анализа использовался ранговый коэффициент корреляции Спирмена. Различия считали статистически значимыми при p<0,05.

Результаты. Всего включено 69 пациентов с СКВ (с/без АФС). Уровень CitH3 в сыворотке крови оказался значимо выше у пациентов с СКВ по сравнению со здоровыми лицами (контроль; рис. 1).

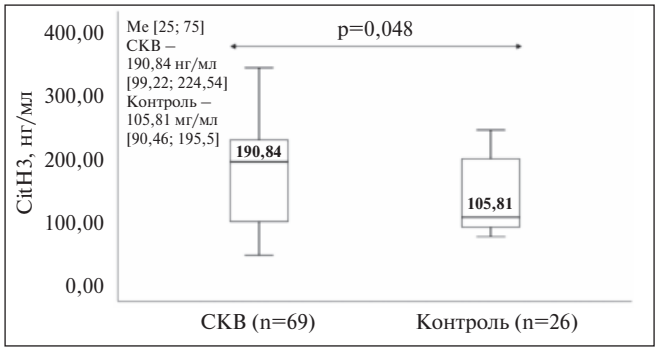

Рис. 1. *Уровень CitH3 у пациентов с СКВ и в контрольной группе*
Fig. 1. *Levels of CitH3 in patients with SLE and healthy controls*

Пациенты были разделены на две группы: в 1-ю группу вошел 41 пациент с умеренной и высокой активностью СКВ (SLEDAI-2K≥6), во 2-ю – 28 больных с низкой активностью или ремиссией (SLEDAI-2K<6). У пациентов с высокой активностью СКВ уровень CitH3 в сыворотке крови был значимо выше, чем у больных с низкой активностью (рис. 2).

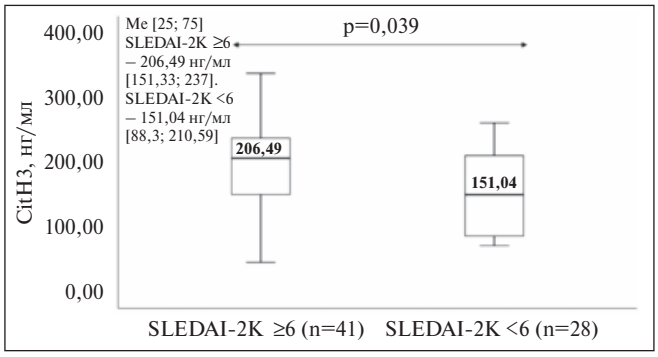

Рис. 2. *Уровень CitH3 и активность СКВ*
Fig. 2. *CitH3 levels and SLE activity*

В табл. 3 представлено содержание CitH3 в сыворотке крови у пациентов в соответствии с клиническими критериальными признаками СКВ. Высокая концентрация CitH3 в крови у пациентов с СКВ ассоциировалась с фотосенсибилизацией в анамнезе, а низкая – с серозитом в анамнезе.

Была обнаружена обратная корреляция между уровнем CitH3 и абсолютным числом лимфоцитов (рис. 3). Уровень CitH3 не зависел от других лабораторных показателей как иммунологических, так и гематологических.

Концентрация CitH3 в сыворотке крови у пациентов с СКВ и СКВ+АФС не различалась, и ее медиана составляла 169,24 [99,22; 233,98] и 200,58 [114,45; 223,86] нг/мл соответственно (p=0,39). При этом SLEDAI-2K у пациентов с СКВ без АФС был значимо выше, чем у больных СКВ+АФС (14 [8; 19] и 4 [2; 8] соответственно; p<0,0001), а ИП был выше у пациентов с СКВ+АФС (2 [2; 4] и 0,5 [0; 1] соответственно; p<0,0001). Наличие тромбозов и акушерской патологии в анамнезе при АФС не ассоциировалось с повышением уровня CitH3.

У нелеченых пациентов (n=5) концентрация CitH3 в крови была несколько выше, чем у тех, кто получал иммуносупрессивную терапию (260,19 [190,84; 272,8] и 181,63 [97,92; 223,17] нг/мл соответственно; p=0,077), однако эти различия не достигали статистической значимости. Использование ГК, ГКХ, БПВП, ГИБП, антикоагулянтов и антиагрегантов значимо не влияло на уровень CitH3.

Обсуждение. Накапливается все больше данных об активной роли врожденной иммунной системы в развитии аутоиммунного ответа и повреждения тканей при СКВ [16].

Таблица 3. Уровень CitH3 в зависимости от клинических проявлений СКВ, нг/мл
Table 3. Levels of CitH3 in relation to clinical manifestations of SLE, ng/ml

Критерии СКВ	Уровень CitH3		p
	есть критерий	нет критерия	
Сыпь на скулах, M±σ	188,26±69,66	163,94±69,02	0,15
Дискоидная сыпь	196,54 [179,4; 213,67]	190,84 [98,57; 228,93]	0,77
Фотосенсибилизация	**213,42 [164,48; 243,99]**	**179,42 [89,74; 219,28]**	**0,044***
Язвы в полости рта	210,08 [109,14; 237,03]	179,42 [97,3; 221,52]	0,23
Артрит	182,17 [109,14; 233,33]	195,86 [93,47; 223,61]	0,63
Серозит	**164,48 [89,38; 221,52]**	**207,75 [170,06; 234,34]**	**0,029***
Поражение почек	171,69 [90,2; 222,69]	199,14 [134,24; 233,65]	0,37
Поражение ЦНС	96,68 [75,1; 207,75]	194,4 [113,38; 233,6]	0,109
Гематологические нарушения	197,5 [99,2; 233,9]	178,4 [103,6; 208,4]	0,33

Примечание. Данные представлены как Me [25-й; 75-й перцентили], если не указано иначе. ЦНС – центральная нервная система; * – p <0,05.

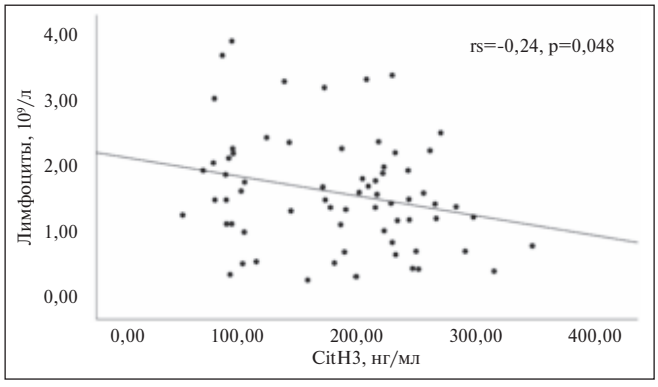

Рис. 3. *Корреляция уровня CitH3 с числом лимфоцитов*
Fig. 3. *Correlation of CitH3 level with lymphocyte count*

При изучении патогенеза СКВ особое внимание уделяется нейтрофилам и их способности продуцировать NETs (табл. 4) [17–28].

Хотя CitH3 является специфическим маркером нетоза, мы не встретили в литературе результатов определения его содержания в крови у пациентов с СКВ. Внимание исследователей сосредоточено преимущественно на изучении способности сыворотки крови к разрушению NETs [17, 19], образованию NETs нейтрофилами [18, 22, 24] или на оценке концентрации других маркеров нетоза в крови [21, 23, 25–28]. В нашей работе обнаружено повышение уровня маркера нетоза CitH3 в сыворотке крови у пациентов с СКВ, который был особенно высоким при высокой активности заболевания. CitH3 образуется в процессе посттрансляционной модификации пептидиларгинина в цитруллин под действием фермента PAD4 в ходе нетоза [29]. CitH3 высвобождается в кровоток при формировании NETs, в связи с чем данный показатель служит непрямым маркером нетоза [9]. Повышение уровня CitH3 выявлено у больных РА [30], ювенильным идиопатическим артритом [31], бронхиальной астмой [32], онкологическими заболеваниями [33], коронавирусной инфекцией (COVID-19) [34, 35] и сепсисом [36, 37]. Продемонстрирована роль CitH3 как маркера активности [30, 31] и тяжести ряда патологий [36], а также как предиктора нежелательного исхода заболеваний [36, 37]. При высокой активности ювенильного идиопатического артрита [31] и РА [30] концентрация CitH3 была значимо выше, чем при низкой активности, что позволяет рассматривать его как маркер воспаления. Полученные нами результаты также свидетельствуют о том, что CitH3 является биомаркером активности воспалительного процесса. Мы впервые исследовали уровень CitH3 у больных СКВ. Наши результаты согласуются с данными других авторов, которые также обнаружили повышенный нетоз при СКВ, используя другие методы исследования NETs [17–28]. Имеющиеся на сегодня данные о связи нетоза с клинико-лабораторными проявлениями СКВ остаются противоречивыми.

Среди специфических маркеров нетоза был исследован комплекс МПО-ДНК. Повышение концентрации МПО-ДНК в крови пациентов с СКВ было обнаружено в ряде исследований [25–28]. Так, M. Bruschi и соавт. [25] выявили связь повышения уровня МПО-ДНК с ВН, но не с активностью СКВ. S. Moore и соавт. [26] подтвердили, что у пациентов с СКВ уровень МПО-ДНК выше, чем у здоровых лиц. В этой работе не обнаружено связи между МПО-ДНК и текущей активностью СКВ, однако отмечено, что у пациентов с исходно высоким уровнем МПО-ДНК в будущем развивалось обострение. Авторы заключили, что NETs могут быть предиктором обострения СКВ. N. Hanata и соавт. [27] установили, что больные СКВ с высоким уровнем NETs в сыворотке имели низкую концентрацию анти-дсДНК и высокую воспалительную активность, тогда как у пациентов с низким содержанием NETs выявлены более высокий уровень анти-дсДНК и образование иммунных комплексов. T. Reshetnyak и соавт. [28] наблюдали повышение содержания МПО-ДНК у больных с высокой активностью СКВ, ВН и иммунологическими нарушениями. Кроме того, была обнаружена прямая корреляция концентрации МПО-ДНК с индексом SLEDAI-2K и уровнем анти-дсДНК, а также обратная корреляция содержания МПО-ДНК и компонентов комплемента C3, C4. У 25% больных с АФС имелись позитивные значения МПО-ДНК, однако связь между ними и клинико-лабораторными проявлениями АФС не обнаружена.

Таблица 4. Нетоз при СКВ
Table 4. NETosis in SLE

Источник	Пациенты	Методы	Результаты
A. Hakkim и соавт., 2010 [17]	61 больной СКВ, 30 больных РА, 54 здоровых донора (контроль)	Инкубация NETs с сывороткой обследованных в течение 6 ч для оценки степени деградации NETs	1. Разрушение NETs было снижено у пациентов с СКВ по сравнению со здоровыми лицами (контроль) или больными РА. 2. В сыворотке больных СКВ было больше антител к NETs. 3. Нарушение деградации NETs коррелировало с повышением уровня антител к NETs. 4. У пациентов с нарушением деградации NETs был более высокий уровень антител к дсДНК, АНФ и чаще выявлялся ВН
E. Villanueva и соавт., 2011 [18]	10 больных СКВ и контрольная группа	Оценка образования NETs LDGs и гранулоцитами нормальной плотности у больных СКВ и нейтрофилами у лиц контрольной группы	1. NETs значимо больше синтезировались LDGs больных СКВ. Число LDGs не было связано с активностью СКВ. 2. NETs обнаруживались в биоптатах почек у больных ВН и в очагах кожного поражения у больных СКВ. 3. NETs было больше при ВН IV класса по сравнению с III классом
J. Leffler и соавт., 2012 [19]	69 больных СКВ, 77 здоровых доноров	Оценка способности сыворотки больных СКВ к деградации NETs	1. 41% пациентов имели сниженную способность к разрушению NETs. 2. Нарушение деградации NETs ассоциировалось с высокой активностью СКВ и активным нефритом
C. Carmona-Rivera и соавт., 2015 [20]	Больные СКВ, здоровые доноры (контроль)	Исследование NETs у больных СКВ и в контроле	1. Уровень MMP9 был выше в NETs у больных СКВ. 2. NETs оказывали повреждающее действие на сосудистый эндотелий
S. Zhang и соавт., 2014 [21]	54 больных СКВ, 43 здоровых донора (контроль)	1. Определение уровня сцДНК в крови. 2. Определение активности ДНКазы 1	1. Уровень сцДНК был значимо выше у пациентов с СКВ. 2. Уровень сцДНК был значимо выше у пациентов с ВН, особенно при ВН IV класса. 3. У пациентов с СКВ была снижена активность ДНКазы 1 и повышен уровень LDGs. 4. Уровень сцДНК прямо коррелировал с уровнем суточной протеинурии, числом LDGs, абсолютным числом нейтрофилов и обратно – с уровнем альбумина
M. van der Linden и соавт., 2018 [22]	55 больных СКВ, 38 больных СКВ+АФС, 28 больных ПАФС, 27 здоровых доноров (контроль)	Определение образования NETs нейтрофилами здоровых доноров при воздействии плазмы больных	1. Наиболее высокий уровень образования NETs был у пациентов с СКВ±АФС. 2. Высвобождение NETs не коррелировало с активностью СКВ или АФС. 3. Установлена корреляция числа NETs с уровнем АНФ и анти-дсДНК
I. Jeremic и соавт., 2019 [23]	111 больных СКВ, 50 здоровых доноров (контроль)	Оценка уровня сцДНК, активности МПО, нетолитической активности	1. Уровень сцДНК и активность МПО крови были значимо выше у пациентов с СКВ. Нетолитическая активность была ниже у пациентов с СКВ. 2. У нелеченых больных были значимо более высокие уровень сцДНК, активность МПО и ДНКазы 1; уровень анти-дсДНК коррелировал с содержанием сцДНК и активностью МПО
D.H. El- Ghoneimy и соавт., 2019 [24]	50 больных СКВ, 50 здоровых доноров (контроль)	Определение уровня NETs в крови с помощью оценки высвобождения нейтрофильной эластазы	1. Содержание NETs у пациентов с СКВ было выше и положительно коррелировало с уровнем анти-дсДНК, SLEDAI, C3c-компонента комплемента. 2. Содержание NETs значимо не различалось у больных СКВ с ВН и без поражения почек. 3. Содержание NETs было выше у пациентов с активным поражением почек и обратно коррелировало с уровнем суточной протеинурии
M. Bruschi и соавт., 2020 [25]	216 больных СКВ, 50 здоровых доноров (контроль)	Исследование комплекса МПО-ДНК в сыворотке и плазме крови методом ИФА; образования NETs нейтрофилами; активности ДНКазы	1. Уровень МПО-ДНК был повышен в сыворотке крови у пациентов с СКВ по сравнению с контролем. 2. Уровень МПО-ДНК был повышен у пациентов с СКВ и ВН по сравнению с пациентами без поражения почек. 3. Образование NETs нейтрофилами не было увеличено у больных СКВ. 4. Активность ДНКазы была снижена у пациентов с ВН

Источник	Пациенты	Методы	Результаты
S. Moore и соавт., 2020 [26]	417 больных СКВ, 100 здоровых доноров (контроль)	Исследование комплекса МПО-ДНК методом ИФА	1. У пациентов с СКВ был повышен уровень МПО-ДНК в плазме крови. 2. Уровень NETs был связан с увеличением SLEDAI в течение последующих 3 мес. 3. Уровень МПО-ДНК был повышен у пациентов с ВН, артериальными тромбозами в анамнезе
N. Hanata и соавт., 2022 [27]	33 больных СКВ, 19 здоровых доноров (контроль)	Изучение комплекса МПО-ДНК методом ИФА	1. Уровень МПО-ДНК был повышен у пациентов с СКВ. 2. Уровень МПО-ДНК обратно коррелировал с концентрацией анти-дсДНК, положительно коррелировал с содержанием СРБ. 3. Не выявлено связи комплекса МПО-ДНК с активностью СКВ
T. Reshetnyak и соавт., 2023 [28]	30 больных СКВ, 47 больных СКВ+АФС, 40 больных ПАФС, 20 здоровых доноров (контроль)	Исследование комплекса МПО-ДНК методом ИФА	1. Уровень МПО-ДНК был повышен у пациентов с СКВ. 2. Уровень МПО-ДНК был повышен у пациентов с активной СКВ. 3. Уровень МПО-ДНК был повышен у пациентов с ВН по сравнению с пациентами без поражения почек. 4. Уровень МПО-ДНК положительно коррелировал с SLEDAI-2K, концентрацией анти-дсДНК и обратно – с содержанием С3-, С4-компонентов комплемента

Примечание. РА – ревматоидный артрит; АНФ – антинуклеариный фактор; ВН – волчаночный нефрит; LDGs (low-density granulocytes) – гранулоциты низкой плотности; ММП – матриксная металлопротеиназа; ПАФС – первичный антифосфолипидный синдром.

В нескольких работах было установлено повышение уровня сцДНК – неспецифического маркера нетоза [21, 23]. Так, S. Zhang и соавт. [21] выявили у пациентов с СКВ значимое повышение содержания сцДНК в плазме крови по сравнению со здоровыми донорами (контроль). У пациентов с ВН уровень сцДНК был значимо выше, чем у пациентов без поражения почек. Авторами была отмечена прямая корреляция концентрации сцДНК с уровнем суточной протеинурии, абсолютным числом нейтрофилов и LDGs в крови, но не с иммунологическими маркерами или активностью СКВ. Другие исследователи также обнаружили более высокий уровень сцДНК в сыворотке крови больных СКВ по сравнению со здоровыми, но не отметили связи между сцДНК и клиническими проявлениями СКВ [23].

Более высокий уровень NETs в крови у пациентов с СКВ может быть обусловлен нарушением деградации NETs или повышенным их образованием нейтрофилами. A. Hakkim и соавт. [17] продемонстрировали, что уровень NETs был повышен у пациентов с СКВ по сравнению со здоровыми донорами за счет снижения деградации NETs в крови больных СКВ. У 36,1% пациентов с СКВ было отмечено нарушение деградации NETs за счет наличия антител к NET или ингибиторов ДНКазы I в сыворотке крови. При этом пациенты с нарушением деградации NETs имели более высокий уровень анти-дсДНК и АНФ, у них чаще выявлялся ВН. В другой работе также было обнаружено, что деградация NETs была снижена у пациентов с СКВ по сравнению со здоровыми (контроль) [19]. Нарушение элиминации NETs и, соответственно, более высокий их уровень в данной когорте ассоциировался с высокой активностью СКВ, наличием гломерулонефрита, плеврита и иммунологической активностью. При проспективном наблюдении авторы выявили, что при достижении ремиссии СКВ у большинства пациентов восстанавливалась способность к разрушению NETs.

Изучались различные параметры, связанные со способностью нейтрофилов к образованию NETs при СКВ. E. Villanueva и соавт. [18] продемонстрировали, что LDGs – «патологическая» субпопуляция нейтрофилов, обладающих провоспалительным фенотипом, – у пациентов с СКВ спонтанно продуцировали больше NETs, чем нейтрофилы здоровых (контроль) или гранулоциты нормальной плотности больных СКВ. Значимых корреляций между количеством LDGs, подвергшихся нетозу, и активностью СКВ или уровнем/наличием специфических аутоантител не было. D.H. El-Ghoneimy и соавт. [24] также обнаружили значимо более высокое образование NETs нейтрофилами у пациентов с ювенильной СКВ по сравнению со здоровыми донорами (контроль). Авторы отметили, что уровень NETs положительно коррелировал с индексом активности SLEDAI, уровнем анти-дсДНК, суточной протеинурии и обратно коррелировал с содержанием С3с-компонента комплемента, но не зависел от наличия и уровня антител к фосфолипидам (аФЛ). В свою очередь, M. van der Linden и соавт. [22] продемонстрировали, что плазма пациентов с СКВ с/без АФС значимо больше стимулировала образование NETs нейтрофилами, чем плазма здоровый лиц (контроль). Авторы не обнаружили связи между выраженностью нетоза и активностью СКВ или АФС. Более значительное образование NETs наблюдалось у пациентов с повышенным уровнем АНФ и анти-дсДНК. Не выявлено связи между выраженностью нетоза и клиническими проявлениями СКВ и АФС или наличием аФЛ. Наши результаты согласуются с данными M. van der Linden и соавт. [22] об отсутствии значимой разницы между уровнем нетоза (содержанием CitH3) у пациентов с СКВ и СКВ+АФС, а также зависимости от клинических проявлений АФС.

Лекарственная терапия СКВ может влиять на уровень NETs и была изучена в ряде работ [22, 23]. I. Jeremic и соавт. [23] установили, что уровень сцДНК и активность МПО были значимо выше у нелеченых больных с СКВ (n=35) по сравнению с пациентами, получавшими терапию. Только в группе «без терапии» была выявлена корреляция уровня анти-дсДНК с концентрацией сцДНК и активностью МПО. В нашем исследовании обнаружена тенденция к более высокому уровню CitH3 у пациентов с СКВ, ранее не получавших

лекарственную терапию, однако это различие не достигало статистической значимости, что, вероятно, связано с малым числом больных (n=5). M. van der Linden и соавт. [22] не обнаружили различий в образовании NETs у пациентов, получавших и не получавших ГК и иммуносупрессанты.

Результаты нашей работы согласуются с данными исследований, в которых выявлено повышение нетоза при СКВ. Особенно высокий уровень CitH3 отмечался у пациентов с высокой активностью СКВ. Похожие результаты были получены другими авторами, которые изучали нетоз, используя другие методы [19, 24, 26, 28]. Кроме того, мы выявили обратную корреляция между CitH3 и общим числом лимфоцитов, что свидетельствует в пользу связи между активностью СКВ и CitH3, поскольку лимфопения является одним из маркеров активности СКВ. В отличие от других авторов, мы не обнаружили зависимости между CitH3 и ВН, что может быть обусловлено активацией PAD4-независимого нетоза, не связанного с цитруллинированием гистонов, при развитии поражения почек у больных СКВ. Кроме того, возможной причиной является влияние проводимой лекарственной терапии. Существующие противоречивые данные о связи NETs с клинико-лабораторными проявлениями СКВ, вероятно, обусловлены гетерогенностью и малым числом больных и разными методами определения NETs.

Ограничениями нашей работы были небольшая выборка пациентов, в том числе никогда не получавших иммуносупрессивную терапию, разница в активности СКВ у пациентов с СКВ и СКВ+АФС и длительный посттромботический период у больных, перенесших тромбозы.

Заключение. Таким образом, у пациентов с СКВ наблюдалось повышение уровня специфического маркера нетоза – CitH3, которое ассоциировалось с умеренной и высокой активностью заболевания. CitH3 является перспективным биомаркером активности СКВ. Требуются дальнейшие исследования нетоза и его роли в развитии СКВ, а также возможности терапевтического воздействия на данный путь патогенеза.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Насонов ЕЛ, Соловьев СК, Аршинов АВ. Системная красная волчанка: история и современность. Научно-практическая ревматология. 2022;60(4):397-412.
[Nasonov EL, Soloviev SK, Arshinov AV. Systemic lupus erythematosus: history and modernity. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya*. 2022;60(4):397-412. (In Russ.)].
2. Pan L, Lu MP, Wang JH, et al. Immunological pathogenesis and treatment of systemic lupus erythematosus. *World J Pediatr.* 2020 Feb;16(1):19-30. doi: 10.1007/s12519-019-00229-3.
3. 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.
4. Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol.* 2014; 9:181-218. doi: 10.1146/annurev-pathol-020712-164023.
5. 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.
6. Fousert E, Toes R, Desai J. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) Take the Central Stage in Driving Autoimmune *Responses. Cells.* 2020 Apr 8;9(4):915. doi: 10.3390/cells9040915.
7. 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.
8. Sørensen OE, Borregaard N. Neutrophil extracellular traps – the dark side of neutrophils. *J Clin Invest.* 2016 May 2; 126(5): 1612-20. doi: 10.1172/JCI84538.
9. Thalin C, Lundström S, Seignez C, et al. Citrullinated histone H3 as a novel prognostic blood marker in patients with advanced cancer. *PLoS One.* 2018 Jan 11;13(1):e0191231. doi: 10.1371/journal.pone.0191231.
10. Paues Göranson S, Thalin C, Lundström A, et al. Circulating H3Cit is elevated in a human model of endotoxemia and can be detected bound to microvesicles. *Sci Rep.* 2018 Aug 23;8(1):12641. doi: 10.1038/s41598-018-31013-4.
11. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1997 Sep;40(9):1725. doi: 10.1002/art.1780400928.
12. 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.
13. Touma Z, Urowitz MB, Ibanez D, et al. SLEDAI-2k 10 days versus SLEDAI-2k 30 days in a longitudinal evaluation. *Lupus*. 2011 Jan; 20(1):67-70. doi: 10.1177/0961203310385163.
14. Gladman DD, Goldsmith CH, Urowitz MB, et al. The Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology (SLICC/ACR) Damage Index for Systemic Lupus Erythematosus International Comparison. *J Rheumatol.* 2000 Feb;27(2):373-6.
15. Александрова ЕН, Новиков АА, Решетняк ТМ и др. Антитела к 2-гликопротеину 1 и антитела к кардиолипину при антифосфолипидном синдроме: анализ чувствительности и специфичности. Клиническая медицина. 2003;(9):25-31.
[Aleksandrova EN, Novikov AA, Reshetnyak TM, et al. Antibodies to 2-glycoprotein 1 and antibodies to cardiolipin in antiphospholipid syndrome: sensitivity and specificity analysis. *Klinicheskaya meditsina*. 2003;(9): 25-31. (In Russ.)].
16. Bolouri N, Akhtari M, Farhadi E, et al. Role of the innate and adaptive immune responses in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Inflamm Res.* 2022 Jun; 71 (5-6):537-554. doi: 10.1007/s00011-022-01554-6
17. Hakkim A, Fürnrohr 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.
18. Villanueva E, Yalavarthi S, Berthier CC, et al. Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2011 Jul 1;187(1): 538-52. doi: 10.4049/jimmunol.1100450. Epub 2011 May 25.
19. Leffler J, Martin M, Gullstrand B, et al. Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease. *J Immunol.* 2012 Apr 1;188(7):3522-31. doi: 10.4049/jimmunol.1102404. Epub 2012 Feb 17.
20. Carmona-Rivera C, Zhao W, Yalavarthi S, et al. Neutrophil extracellular traps induce endothelial dysfunction in systemic lupus erythematosus through the activation of matrix metalloproteinase-2. *Ann Rheum Dis.* 2015 Jul;74(7):1417-24. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204837. Epub 2014 Feb 25.
21. Zhang S, Lu X, Shu X, et al. Elevated plasma cfDNA may be associated with active lupus nephritis and partially attributed to abnormal regulation of neutrophil extracellular traps (NETs) in patients with systemic lupus erythematosus. *Intern Med.* 2014;53(24): 2763-71. doi: 10.2169/internalmedicine.53.2570
22. Van der Linden M, van den Hoogen LL, Westerlaken 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):1228-1234. doi: 10.1093/rheumatology/key067
23. Jeremic I, Djuric O, Nikolic M, et al. Neutrophil extracellular traps-associated markers are elevated in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int*. 2019 Nov; 39(11):1849-1857. doi: 10.1007/s00296-019-04426-1. Epub 2019 Aug 23.
24. El-Ghoneimy DH, Hesham M, Hasan R, et al. The behavior of neutrophil extracellular traps and NADPH oxidative activity in pediatric systemic lupus erythematosus: relation to disease activity and lupus nephritis. *Clin Rheumatol*. 2019 Sep;38(9):2585-2593. doi: 10.1007/s10067-019-04547-9
25. Bruschi M, Bonanni A, Petretto A, et al. Neutrophil Extracellular Traps Profiles in Patients with Incident Systemic Lupus Erythematosus and Lupus Nephritis. *J Rheumatol*. 2020 Mar;47(3):377-386. doi: 10.3899/jrheum.181232
26. Moore S, Juo HH, Nielsen CT, et al. Role of Neutrophil Extracellular Traps Regarding Patients at Risk of Increased Disease Activity and Cardiovascular Comorbidity in Systemic Lupus Erythematosus. *J Rheumatol*. 2020 Nov 1;47(11):1652-1660. doi: 10.3899/jrheum.190875. Epub 2019 Dec 15.
27. Hanata N, Ota M, Tsuchida Y, et al. Serum extracellular traps associate with the activation of myeloid cells in SLE patients with the low level of anti-DNA antibodies. *Sci Rep*. 2022 Nov 1;12(1):18397. doi: 10.1038/s41598-022-23076-1.
28. Reshetnyak T, Nurbaeva K, Ptashnik I, Kudriaeva A, Belogurov A, Lila A, Nasonov E. Markers of NETosis in Patients with Systemic Lupus Erythematosus and Antiphospholipid Syndrome. *Int J Mol Sci*. 2023 May 24;24(11):9210. doi: 10.3390/ijms24119210.
29. Mutua V, Gershwin LJ. A Review of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Disease: Potential Anti-NETs Therapeutics. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2021 Oct;61(2):194-211. doi: 10.1007/s12016-020-08804-7.
30. Peng W, Wu S, Wang W. Correlation of serum citrullinated histone H3 levels with disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2023 Feb 23. doi: 10.55563/clinexprheumatol/i3bcss. Online ahead of print.
31. Parackova Z, Zentsova I, Malcova H, et al. Increased histone citrullination in juvenile idiopathic arthritis. *Front Med (Lausanne)*. 2022 Aug 19;9:971121. doi: 10.3389/fmed.2022.971121.
32. Kuczia P, Zuk J, Iwaniec T, et al. Citrullinated histone H3, a marker of extracellular trap formation, is increased in blood of stable asthma patients. *Clin Transl Allergy*. 2020 Jul 13;10:31. doi: 10.1186/s13601-020-00337-8.
33. Ronchetti L, Terrenato I, Ferretti M, et al. Circulating cell free DNA and citrullinated histone H3 as useful biomarkers of NETosis in endometrial cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2022 Apr 21;41(1):151. doi: 10.1186/s13046-022-02359-5
34. Zuo Y, Yalavarthi S, Shi H, et al. Neutrophil extracellular traps in COVID-19. *JCI Insight*. 2020 Jun 4;5(11):e138999. doi: 10.1172/jci.insight.138999.
35. Ng H, Havervall S, Rosell A, et al. Circulating Markers of Neutrophil Extracellular Traps Are of Prognostic Value in Patients With COVID-19. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2021 Feb;41(2):988-994. doi: 10.1161/ATVBAHA.120.315267.
36. Tian Y, Russo RM, Li Y, et al. Serum citrullinated histone H3 concentrations differentiate patients with septic verses non-septic shock and correlate with disease severity. *Infection*. 2021 Feb;49(1):83-93. doi: 10.1007/s15010-020-01528-y.
37. Pan B, Li Y, Liu Y, et al. Circulating CitH3 Is a Reliable Diagnostic and Prognostic Biomarker of Septic Patients in Acute Pancreatitis. *Front Immunol*. 2021 Nov 17;12: 766391. doi: 10.3389/fimmu.2021.766391.

Поступила/отрецензирована/принята к печати
Received/Reviewed/Accepted
11.05.2023/16.07.2023/19.07.2023

Заявление о конфликте интересов/Conflict of Interest Statement

Статья подготовлена в рамках фундаментальной научной темы № 122040400024-7.
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 article has been conducted within basic scientific topic № 122040400024-7.
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
Черкасова М.В. https://orcid.org/0000-0002-3246-1157
Лила А.М. https://orcid.org/0000-0002-6068-3080