

ИММУНОЛОГИЯ

© АВДЕЕВА А.С., АЛЕКСАНКИН А.П., 2024

Авдеева А.С.¹, Алексанкин А.П.^{1,2}

НЕТОЗ НЕЙТРОФИЛОВ: МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ОЦЕНКИ И РОЛЬ В ПАТОГЕНЕЗЕ ИММУНОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ РЕВМАТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

¹ФГБНУ Научно-исследовательский институт ревматологии им В.А. Насоновой, 115522, Москва, Россия;

² Научно-исследовательский институт морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», 117418, Москва, Россия

Нейтрофильные гранулоциты – это наиболее многочисленная группа миелоидных клеток, обеспечивающих защиту организма путем производства активных форм кислорода и хлора, фагоцитоза патогенов и мертвых клеток, продукции хемокинов и цитокинов, и выброса внеклеточных нейтрофильных ловушек – NETs (Neutrophil Extracellular Traps), состоящих из хроматина и гранул, способных связывать и уничтожать микроорганизмы. При иммуновоспалительных ревматических заболеваниях (ИВРЗ) образование NETs приводит к повреждению органов и тканей, что сопровождается воспалением и тромбообразованием. Этот процесс обусловлен высвобождением большого количества белков и ферментов, активирующих макрофаги и лимфоциты, а также аутоантигенов, что стимулирует образование аутоантител. Повышенная продукция миелопероксидазы (МПО) и протейназы – 3 (ПП-3) имеет важное значение в патогенезе системных васкулитов, нуклеиновые кислоты и молекулы ДНК являются аутоантигенами при системной красной волчанке (СКВ), цитруллинированные гистоны можно рассматривать как неоптитопы, вызывающие формирование антител к цитруллинированным белкам (АЦБ) при ревматоидном артрите (РА).

Нетоз могут вызывать антитела, иммунные комплексы, цитокины, хемокины, микрокристаллы. В настоящее время описаны две принципиально различающиеся формы нетоз: классический или суицидальный нетоз, который приводит к гибели клетки, и прижизненный или витальный, при котором клетка не погибает и сохраняет многие эффекторные функции.

Учитывая большой вклад нетоза в патогенез ИВРЗ в литературе широко обсуждаются практические вопросы оценки нетоза у различных групп пациентов. Среди методов можно выделить микроскопию, ммуноферментный анализ продуктов нетоза, а также метод многоцветной проточной цитометрии, который позволяет выявлять основные компоненты NETs в цельной крови. Эта методика позволяет быстро и надежно оценить несколько тысяч клеток на образец и не зависит от потенциальной ошибки наблюдателя – двух основных ограничений микроскопической количественной оценки. Использование цитометрии облегчает прямое обнаружение *in vivo* циркулирующих NETs в образцах крови.

Целью публикации является обобщение и анализ наиболее важных исследований, касающихся роли нетоза нейтрофилов в патогенезе ИВРЗ, а также обсуждаются перспективные направления лабораторной диагностики нетоза. Был проведен исчерпывающий поиск в базах данных MEDLINE (через PubMed), с использованием MESH (medical subjects headings) терминологии и ключевых слов, включая ревматоидный артрит, системная красная волчанка, системные васкулиты, патогенез заболевания, нетоз, многоцветная проточная цитометрия, микроскопия, ммуноферментный анализ.

Ключевые слова: иммуновоспалительные ревматические заболевания; нетоз; патогенез заболевания; многоцветная проточная цитометрия

Для цитирования: Авдеева А.С., Алексанкин А.П. Нетоз нейтрофилов: методы лабораторной оценки и роль в патогенезе иммуновоспалительных ревматических заболеваний (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69(5): 206-214.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-5-206-214>

Для корреспонденции: Авдеева Анастасия Сергеевна, д-р мед. наук, зав. лабораторией иммунологии и молекулярной биологии ревматических заболеваний; e-mail: 9056249400@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена за счет средств бюджетного финансирования на выполнение государственного задания по теме 1021051402790-6.

Поступила 24.01.2024
Принята к печати 03.04.2024
Опубликовано 25.04.2024

Avdeeva A.S.I, Aleksankin A.P. 1,2

NETosis: ASSESSMENT METHODS AND ROLE IN THE PATHOGENESIS OF SYSTEMIC AUTOIMMUNE RHEUMATIC DISEASES (REVIEW OF LITERATURE)

1 V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russia;

2 Avtsyn research institute of human morphology of federal state budgetary scientific institution "Petrovsky national research centre of surgery" Moscow, Russia

Neutrophil granulocytes are the most numerous group of myeloid cells that provide protection to the body by producing reactive

oxygen and chlorine species, phagocytosis of pathogens and dead cells, production of chemokines and cytokines, and release of NETs (Neutrophil Extracellular Traps), consisting of chromatin and granules, capable of binding and destroying microorganisms. In systemic autoimmune rheumatic diseases (SARDs), the formation of NETs leads to damage to organs and tissues, which is accompanied by inflammation and thrombus formation. This process is caused by the release of a large number of proteins and enzymes that activate macrophages and lymphocytes, as well as autoantigens, which stimulates the formation of autoantibodies. Increased production of myeloperoxidase (MPO) and proteinase 3 (PR-3) is important in the pathogenesis of systemic vasculitis, nucleic acids and DNA molecules are autoantigens in systemic lupus erythematosus (SLE), citrullinated histones can be considered as neoepitopes that cause the formation of antibodies to citrullinated proteins (ACPA) in rheumatoid arthritis (RA).

Netosis can be caused by antibodies, immune complexes, cytokines, chemokines, and microcrystals. Currently, two fundamentally different forms of NETosis have been described: classic or suicidal NETosis, which leads to cell death, and intravital or vital, in which the cell does not die and retains many effector functions.

Considering the large contribution of NETosis in the pathogenesis of SARDs, practical issues of assessing NETosis in various groups of patients are widely discussed in the literature. Methods include microscopy, enzyme-linked immunosorbent assay of NET products, and multicolor flow cytometry, which allows the identification of the main components of NETs in whole blood. This technique allows rapid and reliable assessment of several thousand cells per sample and is not subject to potential observer error; two major limitations of microscopic quantification. The use of cytometry facilitates the direct *in vivo* detection of circulating NETs in blood samples.

The purpose of the publication is to summarize and analyze the most important studies concerning the role of neutrophil NETosis in the pathogenesis of SARDs, and also to discuss promising directions for laboratory diagnosis of NETosis. An exhaustive search was conducted in MEDLINE databases (via PubMed), using MESH (medical subject headings) terminology and keywords, including rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, systemic vasculitides, disease pathogenesis, NETosis, multicolor flow cytometry, microscopy, enzyme-linked immunosorbent assay.

Key words: systemic autoimmune rheumatic diseases; NETosis; pathogenesis; multicolor flow cytometry; review

For citation: Avdeeva A.S., Aleksankin A.P. NETosis: assessment methods and role in the pathogenesis of systemic autoimmune rheumatic diseases (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (5): 206-214 (in Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-5-206-214>

For correspondence: Anastasia Sergeevna Avdeeva, Doctor of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Immunology and Molecular Biology of Rheumatic Diseases; e-mail: 9056249400@mail.ru

Information about authors:

Avdeeva A.S., <https://orcid.org/0000-0003-3057-9175>;

Aleksankin A.P., <https://orcid.org/0000-0001-6686-0896>.

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 24.01.2024

Accepted 03.04.2024

Published 25.04.2024

Нейтрофилы – это наиболее многочисленная и достаточно гетерогенная группа клеток миелоидного происхождения. Они формируют первую линию защиты организма от патогенов, вырабатывая активные формы кислорода и хлора, поглощая и разрушая клетки микробов и погибшие клетки тканей с помощью фагоцитоза. Нейтрофилы секретируют воспалительные цитокины и хемокины, помогая рекрутировать и активировать другие типы клеток иммунной системы. Нейтрофилы способны выбрасывать специальные образования, получившие название внеклеточных нейтрофильных ловушек – NETs, состоящие из хроматина и прикрепленных к нему белков и гранул, которые прочно связывают и уничтожают различные микроорганизмы [1].

Нейтрофилы образуются из стволовых клеток красного костного мозга, поступают в кровоток, циркулируют по кровеносной системе около суток, а затем направляются в ткани. В процессе циркуляции нейтрофилы экспонируют на поверхности рецепторы, набор которых меняется в процессе старения клетки. С возрастом на нейтрофилах увеличивается уровень хемокинового рецептора CXCR4, что способствует проникновению клеток в ткани, преимущественно селезенку, печень и легкие. В этих органах нейтрофилы функционируют как «сторожевые» клетки, обеспечивая местную защиту от патогенов, а после смерти подвергаются фагоцитозу [2-5]. По мере старения нейтрофилы

производят больше активных форм кислорода и более склонны к нетозу [6], что может быть вызвано снижением порога активации при старении клеток. Созревание нейтрофилов подчиняется циркадным ритмам, что обеспечивает лучшую защиту организма от патогенов в дневные часы [7]. Принято различать несколько субпопуляций нейтрофилов. Во-первых, это субпопуляция, для которой характерна повышенная экспрессия интерферон (ИФН)-стимулированных генов [2,5,8]. Роль этих нейтрофилов требует выяснения, но, предположительно, данный субтип нейтрофилов может эффективно реагировать на инфекционные патогены за счет усиленного ответа на интерфероны I типа. Содержание нейтрофилов данного типа повышено у пациентов с тяжелой формой COVID-19, их процент может снижаться при использовании глюкокортикоидов. [9] Данная субпопуляция более многочисленна у женщин, что вероятно отчасти объясняет различия в частоте развития ряда аутоиммунных заболеваний, а также в реакциях иммунной системы при инфекционных заболеваниях у мужчин и женщин. [8]. Также выделяют подмножество провоспалительных нейтрофилов – гранулоцитов низкой плотности. Это название связано с особенностью выделения этих клеток путем центрифугирования в градиенте плотности. Этот тип нейтрофилов продуцирует более высокие уровни ИФН-I (интерферонов I типа), по сравнению с другими видами нейтрофилов, они

больше склонны к нетозу и играют значимую роль в патогенезе аутоиммунных заболеваний. [10,11].

Активация нейтрофилов приводит к различным последствиям на уровне клеток, в частности, они активно мигрируют из кровотока в ткани, где при встрече с патогеном происходит выделение бактерицидного содержимого гранул нейтрофилов. Миграция нейтрофилов в ткани, которые воспалены, дополнительно усиливает воспалительный процесс. Уничтожение патогенов возможно несколькими путями, помимо выделения нескольких видов гранул (дегрануляции), в процессе фагоцитоза в нейтрофилах образуются фагосомы, а затем при слиянии с лизосомами – фаголизосомы, в которых погибают поглощенные микробы. Также при активации нейтрофилов происходит выделение активных форм кислорода и продукция цитокинов с целью рекрутирования других клеток иммунной системы. Наконец, последним из открытых эффекторных механизмов является образование нейтрофильных внеклеточных ловушек, NETs [12,13].

Учитывая важный вклад нетоза в патогенез ИВРЗ, интерес вызывают практические вопросы, связанные с оценкой данного феномена у различных групп пациентов, что позволит лучше понять как патогенез заболевания, так и разработать новые терапевтические стратегии.

Целью публикации является обобщение и анализ наиболее важных исследований, касающихся роли нетоза нейтрофилов в патогенезе ИВРЗ, а также обсуждение перспективных направлений лабораторной диагностики нетоза. Был проведен исчерпывающий поиск в базах данных MEDLINE (через PubMed), с использованием MESH (medical subjects headings) терминологии и ключевых слов, включая ревматоидный артрит, системную красную волчанку, системные васкулиты, патогенез заболевания, нетоз, многоцветную проточную цитометрию, микроскопию, иммуноферментный анализ.

Первоначально считалось, что образование NETs сопровождается гибелью клеток и этот процесс был назван нетозом (NETosis; Neutrophil Extracellular Trap — нейтрофильная внеклеточная ловушка), по аналогии с другими видами клеточной смерти (апоптоз, некроз и т.п.) [1]. Образование NETs может происходить под влиянием различных стимулов, основными из которых являются молекулярные паттерны, характерные для разных видов патогенов, таких как липополисахариды бактериальной клеточной стенки, компоненты вирусов; другие молекулы, характерные для патогенных грибов и простейших. Нетоз могут вызывать также антитела (например, антитела к цитоплазме нейтрофилов – АНЦА, анти LL37 антитела), иммунные комплексы, цитокины, хемокины (интерлейкин (ИЛ)-8, фактор некроза опухоли (ФНО), ИФН- α , - γ , микрокристаллы (моноурата натрия, пирофасфата кальция, холестерина и ряд других) [14-18]. В настоящее время описаны две принципиально различающиеся формы нетоза: классический или суицидальный нетоз, который приводит к гибели клетки, и прижизненный или витальный, при котором клетка не погибает и сохраняет многие эффекторные функции [1]. Классический нетоз представляет собой особую форму программируемой гибели клеток (ПГК), для которой характерны выход компонентов гранул в цитозоль, а также деконденсация хроматина, связанная с изменением модификации гистонов. Фор-

мирование NETs требует активации NADPH оксидазы (NOX), а также сигнального пути, инициируемого протеинкиназой C и опосредованного киназами Raf/MERK/ERK (extracellular signal-regulated kinase). Это инициирует продукцию миелопероксидазы (МПО), эластазы нейтрофилов (НЭ) и пептидил-аргинин деаминазы 4 (ПАД 4). ПАД 4 катализирует цитруллинирование гистонов и способствует деконденсации хроматина, активные формы кислорода вызывают постепенное разобщение и потерю целостности ядерной мембраны, приводя к выходу хроматина в цитозоль через мембранные поры. Лизис клетки и окончательное высвобождение ДНК, связанных с ней цитруллинированных гистонов, и внутриклеточных гранул приводит к формированию внеклеточных ловушек. Нетоз нейтрофилов рассматривается в настоящее время как один из механизмов, входящих в систему врожденного иммунитета [19].

Современные лабораторные методы определения нейтрофильных внеклеточных ловушек

Основными компонентами NETs являются: ДНК, гистоны, протеазы (которые в цельной клетке локализуются в первичных, вторичных и третичных гранулах) [1-3].

В своей работе V. Brinkmann и соавт. [20] описывали различные способы обнаружения и визуализации внеклеточных ловушек, трансмиссионная (просвечивающая) электронная микроскопия (ТЭМ), применяемая для тонкого структурного анализа клетки с использованием просвечивающего электронного микроскопа Leo 906E показала, что они не окружены мембранами. Двойное иммуноокрашивание ультратонких криосрезов для ТЭМ подтвердило наличие нейтрофильной эластазы, комплексов H2A-H2B-ДНК и гистонов H1, H2A, H2B, H3, H4. Применение сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с высоким разрешением на сканирующем электроном микроскопе Leo 1550 показало, что NET содержат плавные участки диаметром 15–17 нм и глобулярные домены размером около 25 нм, которые объединялись в более крупные потоки с диаметром до 50 нм. Кроме того, иммуноокрашивание образцов СЭМ подтвердило локализацию нейтрофильной эластазы в глобулярных доменах NET. Реакция иммунофлуоресценции (РИФ) с помощью конфокального микроскопа Leica TCS-SP использовался для анализа состава NET, содержали белки азурофильных гранул, такие как нейтрофильная эластаза, катепсин G и МПО. Данные, полученные V. Brinkmann, свидетельствуют о том, что структуры, визуализируемые с помощью различных микроскопических методов (РИФ, ТЭМ и СЭМ) идентичны.

Световую микроскопию С.Н. Плескова и соавторы [21] применяли для сравнения морфологических особенностей классического и быстрого нетоза, в этом методе используется иммуноцитохимическое определение ферментативной активности НГ в мазках крови. Для определения продуктов нетоза применялось окрашивание на кислую фосфатазу по Бурстону, окрашивание на щелочную фосфатазу по Шубичу и окрашивание на миелопероксидазу по Грэхему-Кноллу. Морфологические особенности нетоза детектировались методом световой микроскопии.

Оригинальная методика И.И. Долгушина и соавторов [22] для определения нейтрофильных внекле-

точных ловушек, образованных НГ, выделенных из периферической крови, заключалась в окрашивании с помощью 0,04% раствора акридинового оранжевого. Полученные результаты оценивались в люминесцентном микроскопе, используя фильтры, которые обеспечивают возбуждающий свет с длиной волны не более 490 нм и эмиссию с длиной волны 520 нм. В суспензии подсчитывалось число нейтрофилов с сегментированным ядром, клеток с недифференцированным ядром и нейтрофильных внеклеточных ловушек, которые пересчитывали на 100 клеток. Полученные результаты выражали в процентах. Авторы также показали возможность определения нейтрофильных внеклеточных ловушек на спектрофотометре с использованием модифицированного метода Шмидта - Трангаузера для количественного определения ДНК.

Комплекс МПО-ДНК считается одним из самых специфических маркеров нетоза. Иммуноферментный анализ применяемый для определения комплекса МПО-ДНК в плазме и сыворотке крови, является наиболее специфичным, объективным и количественным способом оценки NET [23]. Это наиболее изученный специфический маркер нетоза в крови пациентов с аутоиммунными ревматическими заболеваниями.

В настоящее время исследователей все больше привлекает метод многоцветной проточной цитометрии, который позволяет выявлять основные компоненты NETs в цельной крови. Эта новая методология позволяет быстро и надежно оценить несколько тысяч клеток на образец и не зависит от потенциальной ошибки наблюдателя - двух основных ограничений микроскопической количественной оценки. Использование этой новой технологии облегчает прямое обнаружение *in vivo* циркулирующих NETs в образцах крови. S. Masuda и соавторы [24] провели новый анализ на основе проточной цитометрии для идентификации и количественного определения NETs с использованием антител против ключевых составляющих NETs, в частности антитела к миелопероксидазе. Этот метод применим как к мышинным, так и к человеческим образцам для оценки индуцированных NETs *in vitro* или обнаружения NETs *in vivo* в образцах крови. Суть эксперимента заключалась в том, что клетки в конечной концентрации 1×10^6 кл/мл ресуспендировали в среде RPMI 1640 и индуцировались 100 нМ Форбол-12-миристан-13-ацетат, чтобы вызвать нетоз. Для визуализации внеклеточных ловушек использовали антитела против миелопероксидазы человека меченные FITC, в дальнейшем клетки обрабатывались ДНК-связывающим красителем SYTOX Green, на проточном цитометре наблюдались МПО положительные клетки среди SYTOX Green-положительных нейтрофилов.

В качестве доступных сывороточных маркеров нетоза целесообразно оценивать содержание МПО, НЭ, внеклеточной ДНК и цитруллинированного гистона H3, который является специфичным маркером NETs. M. Vach и соавторы [25] выявили повышенные уровни маркеров активации нейтрофилов - CD11b (интегрин альфа-M) и CD66b (входит в семейство канцероэмбриональных (CEA) антигенов, задействован в активации нейтрофилов, передаче сигналов и межклеточной адгезии) у пациентов с РА по сравнению со здоровыми донорами. Уровень данных маркеров был выше у серо-

позитивных больных и ассоциировался с тяжестью заболевания, выраженностью деструктивных изменений суставов и повышенным уровнем кальпротектина.

Роль нетоза нейтрофилов при аутоиммунных ревматических заболеваниях

Повышенная активность нейтрофилов выполняет позитивную роль с точки зрения защиты организма от различных патогенов, однако, их гиперактивация может быть связана с развитием широкого спектра патологических состояний, в том числе и воспалительных аутоиммунных заболеваний. [26-29]. При аутоиммунных ревматических заболеваниях (P3) образование NETs приводит к повреждению органов и тканей, сопровождающегося воспалением и тромбообразованием. Этот процесс обусловлен высвобождением большого количества белков и ферментов, активирующих макрофаги и лимфоциты, а также аутоантигенов, что стимулирует образование аутоантител [29-33]. Нетоз нейтрофилов, связанный с воспалением, в свою очередь, приводит к высвобождению широкого спектра аутоантигенов, что приводит к образованию аутоантител, которые могут дополнительно стимулировать нетоз. Это подтверждает тесную взаимосвязь между воспалением и аутоиммунитетом.

Системная красная волчанка

СКВ - хроническое системное аутоиммунное заболевание неизвестной этиологии с широким спектром клинических проявлений и плохо предсказуемым течением. Серологически СКВ характеризуется присутствием высоких титров аутоантител к различным компонентам клеточного ядра, не специфичных к определенным органам и тканям [34]. Этиология заболевания остается не до конца установленной. В настоящее время принято считать, что за развитие СКВ отвечает многофакторный процесс, сочетающий генетические, эпигенетические, экологические и гормональные факторы. Долгое время считалось, что ключевую роль в патогенезе СКВ играет нарушение механизмов приобретенного иммунного ответа, однако позднее стало очевидно, что врожденный иммунный ответ играет значительную роль в патогенезе заболевания. Нейтрофилы здоровых доноров, демонстрируя нарушение фагоцитарного клиренса, повышенную склонность к апоптозу, аномальный окислительный метаболизм [35-37].

Впервые участие нетоза в патогенезе аутоиммунных заболеваний детально изучено именно на примере СКВ [38]. При СКВ в крови появляется особая форма гранулоцитов, названная «гранулоциты низкой плотности». Для этих клеток характерна выработка большого количества провоспалительных цитокинов (включая ИФН I типа), они значительно легче «входят» в нетоз, чем нормальные нейтрофилы. NETs гранулоцитов низкой плотности содержат больше аутоантигенов и окисленной митохондриальной ДНК (мтДНК) [26], делая их более мощными иммуностимуляторами. Характеризация гранулоцитов низкой плотности показала, что в основном они представлены среднезрелыми и зрелыми формами, обладающими провоспалительной активностью (в основном это CD10+ клетки, имеющие сегментированные ядра, что характерно для зрелых форм, не зрелые (CD10-) формы менее распространены при СКВ). Выделенный пул нейтрофилов обладает aberrантно-

ми биомеханическими свойствами, что негативно влияет на их выживаемость в мелких кровеносных сосудах, и лежит в основе развития поражений внутренних органов, в первую очередь легочной ткани [39].

В сыворотках пациентов с СКВ был выявлен повышенный уровень мтДНК и антител к мтДНК, что коррелирует с тяжестью заболевания и риском развития волчаночного нефрита [40]. Продукция нейтрофилами ИФН 1 типа и факторов, стимулирующих В-клетки, приводит к ускоренной экспансии В-клеток при СКВ, что вероятно обуславливает увеличение представленности аутореактивных клонов в репертуарах зрелых В-лимфоцитов костного мозга [41]. Показано, что образование комплекса антимикробного пептида LL 37 с ДНК может приводить к активации аутореактивных В-клеток памяти с последующей продукцией анти-LL37 антител, что характерно для пациентов с СКВ [42]. У больных СКВ также наблюдается нарушение деградации нейтрофилов, что приводит к активации комплимента, повышению уровня ИФН-I типа и положительно коррелирует с уровнем аутоантител, а также вероятностью развития волчаночного нефрита [43]. Другими авторами установлено, что HET и пептид LL-37 приводят к активации каспазы -1, ключевого фермента инфламасомы, что сопровождается повышенной продукцией ИЛ-1 и ИЛ-18, а также увеличением количества макрофагов [44]. В недавней работе идентифицировали две популяции нейтрофилов: CD10⁺ и CD10⁻ гранулоциты низкой плотности. Для клеток с фенотипом CD10⁻ характерна более низкая стадия дифференцировки, эти клетки меньше подвержены нетозу, по сравнению с CD10⁺ гранулоцитами [45]. R. Safi и соавторы [46] выявили NETs при различных подтипах кожной волчанки (волчаночный панникулит (49%), острая кожная СКВ (41%) и СКВ (32%). Кроме того, NETs связаны с развитием васкулопатии и могут способствовать образованию атеросклеротических бляшек в коронарных артериях [47]. Связано это с тем, что ферменты, выделяемые нейтрофилами в процессе нетоза, окисляют липопротеины высокой плотности, делая их проатерогенными [48].

Нетоз нейтрофилов приводит к активации антиген-презентирующих клеток (АПК) – дендритных клеток и макрофагов, что, в свою очередь стимулирует продукцию провоспалительных цитокинов, таких как ИФН 1 типа, ИФН γ , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-17, ФНО- α CD4⁺ Т-лимфоцитами, дополнительно усиливая воспаление [33].

Ревматоидный артрит

РА – системное аутоиммунное заболевание, характеризующееся хроническим воспалением синовиальной оболочки суставов и развитием системных проявлений. Для ревматоидного артрита характерна продукция широкого спектра аутоантител, в первую очередь, ревматоидных факторов различных изоформ и антител к белкам, содержащим определенные посттрансляционные модификации (цитруллинированным, ацетилованным, карбамилированным белкам). Наиболее специфичными для РА являются антитела к цитруллинированным белкам (АЦБ). Основным источником цитруллинированных антигенов являются именно нейтрофилы [13].

У пациентов с РА нейтрофилы способствуют поддержанию локального воспаления, участвуют в раз-

витии деструктивных изменений суставов [49]. Нейтрофилы содержат высокие уровни ПАД 2 и ПАД 4, ключевых белков, принимающих участие в ферментативной конверсии аргинина в цитруллин, присоединение которого к белкам превращает их в аутоантигены для образования АЦБ. Избыточное цитруллинирование может быть следствием двух процессов: образования пор клеточной мембраны, что приводит к гиперцитруллинированию цитозольных молекул [50,51] или избыточный нетоз, сопровождающийся выделением цитруллинированных гистонов и виментина во внеклеточное пространство [52-54]. Развитие нетоза нейтрофилов имеет особое значение в синовиальной оболочке сустава и сопровождается синтезом специфических антител [52]. Нетоз способствует поддержанию местного воспаления, а также приводит к стимуляции Т-лимфоцитов и фибробластоподобных синовиальных клеток (FLS – fibroblast-like synoviocytes [29,55]. Помимо ПАД 2 и ПАД 4 в результате нетоза также выделяется ряд белков, таких как матриксные металлопротеиназы (ММП) 8 и ММП 9, липокалин 2, катепсин, эластаза, ответственные за деградацию коллагена в синовиальных мембранах [56]. Белки хряща (хондроцитов), подвергшиеся цитруллинированию и презентируемые CD4⁺ Т- лимфоцитам в виде пептидов, что впоследствии приводит к активации внутриклеточных сигнальных путей и стимуляции нетоза нейтрофилов [57]. У пациентов с РА нетоз усилен не только вследствие влияния АЦБ, а также, поскольку формируется среда с повышенным содержанием провоспалительных цитокинов – ИЛ-8, ИЛ-17А и ФНО- α [58]. Экспериментальные данные свидетельствуют об усилении нетоза при обработке нейтрофилов супернатантами, собранными из стимулированных ИЛ-15 CD69+CD8⁺ Т- лимфоцитов, что также вызывает высвобождение из клеток цитруллинированных белков [59]. Интересно, что продукты нетоза нейтрофилов присутствуют в мокроте родственников пациентов с РА и у лиц, с повышенным риском развития РА, что может указывать на ключевую роль нарушений функционирования нейтрофилов на ранних стадиях развития РА. [60,61]

В клинических исследованиях выявлена позитивная корреляция между выраженностью нетоза, воспалительной активностью, динамикой прогрессирования деструктивных изменений в суставах, развитием внесуставных проявлений у пациентов с РА. В сыворотке крови, синовиальной жидкости в ткани ревматоидных узелков пациентов с РА было обнаружено значительное повышение уровня МПО. Нейтрофилы больных РА демонстрируют повышенную склонность к нетозу по сравнению со здоровыми донорами, причем этот процесс усиливается под влияние аутоантител - РФ и АЦБ [29,62]. В сыворотках больных РА выявлен повышенный уровень комплекса МПО-ДНК и внеклеточных нуклеосом, что коррелирует с уровнем острофазовых показателей и содержанием аутоантител [63]. M. Vach и соавторы [25] проанализировали выраженность нетоза в трех различных когортах пациентов с РА. Авторы продемонстрировали значительное повышение уровня нетоза нейтрофилов во всех когортах пациентов с РА по сравнению со здоровыми донорами. Уровень нетоза коррелировал с воспалительной активностью заболевания и был значительно выше в группе серо-

позитивных по АЦБ пациентов. Для группы серопозитивных больных, авторы установили, что уровень нетоза может помочь достоверно дифференцировать пациентов с ремиссией и активностью заболевания (чувствительностью и специфичностью 68,6% и 75,0% соответственно, $p = 0,04$) в отличие от уровня СРБ, для которого показатели чувствительности и специфичности составили соответственно 37,8 и 100%, $p=0,16$.

В целом нейтрофилы, видимо, играют центральную роль в развитии воспаления как на уровне сустава, так и в других тканях. Нейтрофилы вследствие склонности к нетозу являются вероятно основным источником модифицированных аутоантигенов, которые способствуют развитию воспалительной реакции и запуску адаптивного иммунного ответа с образованием аутоантител.

АНЦА-ассоциированные системные васкулиты и антифосфолипидный синдром

Системные васкулиты (СВ) – это гетерогенная группа заболеваний, основным проявлением которых является воспаление сосудистой стенки. Для АНЦА-ассоциированных системных васкулитов характерно поражение сосудов малого диаметра и продукция антинейтрофильных цитоплазматических антител (АНЦА). Как и при СКВ, нейтрофилы пациентов с СВ имеют повышенную склонность к нетозу [64]. Антигены для АНЦА (миелопероксидаза и протеиназа-3) попадают в межклеточное пространство в результате нетоза, вновь образованные аутоантитела связываются с поверхностью нейтрофилов, что может дополнительно способствовать активации нейтрофилов. Помимо этого, в процессе нетоза освобождаются гистоны и ММП, что способствует дополнительному повреждению эндотелия и усиливает воспаление. [65,66]. Фрагменты NETs обнаружены в тканях пациентов с СВ, включая ткань почек и сосудистые тромбы [65,67]. В ряде работ установлено, что присутствие в крови гранулоцитов низкой плотности ассоциировано с тяжестью заболевания и худшим ответом на терапию [68].

Нейтрофилы больных антифосфолипидным синдромом (АФС) имеют воспалительный фенотип, повышенную активацию ИФН-стимулированных генов и повышение уровня молекул адгезии (CD162), что усиливает связывание нейтрофилов с сосудистой стенкой. [69,70]. Образование NETs в сосудах может инициировать агрегацию тромбоцитов и образование тромбов [71]. У пациентов с АФС обнаружен повышенный уровень внеклеточной ДНК и продуктов нетоза в кровотоке и тканях [72,73].

Повышенный уровень маркеров деградации нейтрофилов у пациентов с ИВРЗ может быть связан не только с повышенным нетозом, но и с нарушением их разборки в результате снижения активности ферментов, обеспечивающих разрушение внеклеточной ДНК. С. Pérez-Sánchez и соавт. [63] продемонстрировали снижение активности ДНКазы в сыворотках пациентов с РА, что приводило к уменьшению деградации ДНК, ее накоплению и прогрессированию заболевания. Несколько отличные данные были получены М. Vach и соавторами [25], которые установили снижение клиренса продуктов деградации нейтрофилов в сыворотках пациентов с РА, однако не нашли отличий уровня ДНКазы у больных с РА и здоровых доноров. У пациентов с нарушением деградации ДНК отмечалась более вы-

сокая активность заболевания, уровни острофазовых показателей, ИЛ-6. Авторы пришли к выводу, что полученные результаты можно объяснить появлением анти-NETs антител (АТ). С.М. de Bont и соавт. [74] проанализировали частоту встречаемости и диагностическое значение анти-NETs АТ у пациентов с РА: частота встречаемости данного класса АТ составляла от 49-51% и была выше в группе серопозитивных по РФ пациентов, однако взаимосвязи уровня анти-NETs АТ с активностью заболевания, уровнем острофазовых показателей выявить не удалось.

Нетоз нейтрофилов может играть не только негативную роль в патогенезе ИВРЗ, но и иметь протективное значение при ряде патологий. Так, протеазы, выделяющиеся в результате нетоза при подагре, способны разрушать провоспалительные цитокины – ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО- α , и тем самым уменьшать воспаление [75]. В недавних работах также было показано, что часть макрофагов, активирующаяся под влиянием продуктов деградации нейтрофилов обладает противовоспалительным действием – подавляют продукцию ИЛ-6 и стимулируют выработку ИЛ-10, причем этот процесс усиливается под влиянием С1q компонента комплекса и LL37 [76].

Таким образом, нейтрофилы принимают активное участие в развитии аутоиммунных РЗ посредством высвобождения в процессе нетоза большого количества белков и ферментов, активирующих макрофаги и лимфоциты, а также аутоантигенов, что стимулирует образование аутоантител, что может являться решающим фактором в развитии аутоиммунных нарушений. Продукция нейтрофилами ИФН 1 типа и факторов, стимулирующих В-клетки, приводит к активации аутореактивных клонов В лимфоцитов и продукции аутоантител. Нейтрофилы способствуют поддержанию локального воспаления в суставах, участвуют в деструкции костной и хрящевой ткани.

Выраженность нетоза нейтрофилов и уровень маркеров их активации позитивно коррелирует с воспалительной активностью РА, развитием внесуставных проявлений. Оценка их уровня может быть полезна для предсказания прогрессирования деструктивных изменений в суставах. Повышенный уровень маркеров деградации нейтрофилов у пациентов с аутоиммунными РЗ может быть связан не только с повышенным нетозом, но и с нарушением удаления NETs в результате снижения активности ферментов, обеспечивающих разрушение внеклеточной ДНК. Учитывая существенный вклад нетоза в патогенез аутоиммунных РЗ, необходимо дальнейшее совершенствование методов лабораторной диагностики для всестороннего изучения данного процесса у различных групп пациентов.

ЛИТЕРАТУРА (П. 2 - 20, 23-76 СМ. REFERENCES)

1. Воробьева Н.В., Черняк Б.В. НЕТоз: молекулярные механизмы, роль в физиологии и патологии. *Биохимия*. 2020; 85: 1383-97. DOI: 10.31857/S0320972520100061.
21. Плескова С.Н., Горшкова Е.Н., Боряков А.В., Крюков Р.Н. Морфологические особенности быстрого и классического нетоза. *Цитология*. 2019; 61: 704-12. DOI: 10.1134/S0041377119090098.

22. Долгушин И.И., Шишкова Ю.С., Савочкина А.Ю. Нейтрофильные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов. М.: РАМН; 2009.

REFERENCES

- Vorob'yova N.V., Chernyak B.V. NETosis: molecular mechanisms, role in physiology and pathology. *Biokhimiya*. 2020; 85: 1383-97. DOI: 10.31857/S0320972520100061. (in Russian)
- Xie X., Shi Q., Wu P., Zhang X., Hiroto K., Su J. et al. Single-cell transcriptome profiling reveals neutrophil heterogeneity in homeostasis and infection. *Nat. Immunol.* 2020; 21:1119-33. DOI: 10.1038/s41590-020-0736-z.
- Grieshaber-Bouyer R., Radtke F.A., Cunin P., Stifano G., Levescot A., Vijaykumar B. et al. The neutrotime transcriptional signature defines a single continuum of neutrophils across biological compartments. *Nat. Commun.* 2021; 12: 2856. DOI: 10.1038/s41467-021-22973-9.
- Ng L.G., Ostuni R., Hidalgo A. Heterogeneity of neutrophils. *Nat. Rev. Immunol.* 2019; 19: 255-65. DOI: 10.1038/s41577-019-0141-8.
- Wigerblad G., Cao Q., Brooks S., Naz F., Gadkari M., Jiang K. et al. Single-cell analysis reveals the range of transcriptional states of circulating human neutrophils. *J. Immunol.* 2022; 209(4):772-82. DOI: 10.4049/jimmunol.2200154.
- Casanova-Acebes M., Nicolás-Ávila A., Li J., Garcia-Silva S., Balachander A., Rubio-Ponce A. et al. Neutrophils instruct homeostatic and pathological states in naive tissues. *J. Exp. Med.* 2018; 215: 2778-95. DOI: 10.1084/jem.20181468.
- Scheiermann C., Gibbs J., Ince L., Loudon A. Clocking in to immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2018; 18: 423-37. DOI: 10.1038/s41577-018-0008-4.
- Gupta S., Nakabo S., Blanco L.P., O'Neil L.J., Wigerblad G., Goel R. et al. Sex differences in neutrophil biology modulate response to type I interferons and immunometabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2020; 117: 16481-91. DOI: 10.1073/pnas.2003603117.
- Sinha S., Rosin N.L., Arora R., Labit E., Jaffer A., Cao L. et al. Dexamethasone modulates immature neutrophils and interferon programming in severe COVID-19. *Nat. Med.* 2022; 28: 201-11. DOI: 10.1038/s41591-021-01576-3.
- Mistry P., Nakabo S., O'Neil L., Goel R.R., Jiang K., Carmona-Rivera C. et al. Transcriptomic, epigenetic, and functional analyses implicate neutrophil diversity in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018; 116: 25222-8. DOI: 10.1073/pnas.1908576116.
- Pember S.O., Barnes K.C., Brandt S.J., Kinkade J.M. Density heterogeneity of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes: gradient fractionation and relationship to chemotactic stimulation. *Blood*. 1983; 61: 1105-15.
- Dinauer M.C. Inflammatory consequences of inherited disorders affecting neutrophil function. *Blood*. 2019; 133: 2130-9. DOI: 10.1182/blood-2018-11-844563.
- Wigerblad G., Kaplan M.J. Neutrophil extracellular traps in systemic autoimmune and autoinflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 2022; 1-15. DOI: 10.1038/s41577-022-00787-0.
- Vorobjeva N.V., Pinegin B.V. Neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation and role in health and disease. *Biochemistry (Moscow)*. 2014; 79: 1286-96. DOI: 10.1134/S0006297914120025.
- Ravindran M., Khan M.A., Palaniyar N. Neutrophil extracellular trap formation: physiology, pathology, and pharmacology. *Biomolecules*. 2019; 9: 365. DOI: 10.3390/biom9080365.
- Yousefi S., Simon D., Stojkov D., Karsonova A., Karaulov A., Simon H.U. *In vivo* evidence for extracellular DNA trap formation. *Cell Death. Dis.* 2020; 11: 300. DOI: 10.1038/s41419-020-24975x.
- Rada B. Neutrophil extracellular traps and microcrystals. *J. Immunol. Res.* 2017; 2896380. DOI: 10.1155/2017/2896380.
- Pinegin B., Vorobjeva N., Pinegin V. Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 2015; 14: 633-40. DOI: 10.1016/j.autrev.2015.03.002.
- Mutua V., Gershwin L.J. A Review of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Disease: Potential Anti-NETs Therapeutics. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*. 2021; 61:194-211. DOI: 10.1007/s12016-020-08804-7.
- Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004; 303: 1532-5. DOI: 10.1126/science.1092385.
- Pleskova S. N., Gorshkova E. N., Boryakov A. V., Kryukov R. N.. Morphological features of rapid and classic NETosis. *Tsitologiya*. 2019; 61: 704-12. DOI: 10.1134/S0041377119090098. (in Russian)
- Dolguшин I.I., Shishkova Yu.S., Savochkina A.Yu. Neutrophil traps and methods for assessing the functional status of neutrophils. Moscow: RAMS; 2009. (in Russian)
- Donkel S.J., Wolters F.J., Ikram M.A., de Maat M.P.M. Circulating myeloperoxidase (MPO)-DNA complexes as marker for neutrophil extracellular traps (NETs) levels and the association with cardiovascular risk factors in the general population. *PLoS ONE* 2021; 16: e0253698. DOI: 10.1371/journal.pone.0253698.
- Masuda S., Shimizu S., Matsuo J., Nishibata Y., Kusunoki Y., Hattanda F. et al. Measurement of NET formation in vitro and in vivo by flow cytometry. *Cytometry A*. 2017; 91(8):822-9. DOI: 10.1002/cyto.a.23169.
- Bach M., Moon J., Moore R., Pan N., Nelson J., Lood C. A Neutrophil activation biomarker panel in prognosis and monitoring of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2020; 72(1):47-56. DOI: 10.1002/art.41062.
- Lood C., Blanco L.P., Purmalek M.M., Carmona-Rivera C., De Ravin S.S., Smith C.K. et al. Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. *Nat. Med.* 2016; 22:146-53. DOI: 10.1038/nm.4027.
- Garcia-Romo G.S., Caielli S., Vega B., Connolly J., Allantaz F., Xu Z. et al. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.* 2011; 3:73ra20. DOI: 10.1126/scitranslmed.3001201.
- Villanueva E., Yalavarthi S., Berthier C.C., Hodgins J.B., Khandpur R., Lin A.M. et al. Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 2011; 187: 538-52. DOI: 10.4049/jimmunol.1100450.
- Khandpur R., Carmona-Rivera C., Vivekanandan-Giri A., Gizinski A., Yalavarthi S., Knight J.S. et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci. Transl. Med.* 2013; 5: 178ra140. DOI: 10.1126/scitranslmed.3005580.
- Jorch S.K., Kubers P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat. Med.* 2017; 23: 279-87. DOI: 10.1038/nm.4294.
- Kessenbrock K., Krumbholz M., Schönemarker U., Back W., Gross W.L., Werb Z., Gröne H.J., Brinkmann V., Jenne D.E. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat. Med.* 2009; 15: 623-5. DOI: 10.1038/nm.1959.
- Li S., Patel R.M., Subramanian V., Gizinski A., Yalavarthi S., Knight J.S. et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci. Transl. Med.* 2013; 5: 178ra40. DOI: 10.1126/scitranslmed.3005580.
- Fousert E., Toes R., Desai J. Neutrophil extracellular traps (NETs) take the central stage in driving autoimmune responses. *Cells*. 2020; 9: 915. DOI: 10.3390/cells9040915.
- Fanouriakis A., Tziolos N., Bertias G., Boumpas D.T. Update on the diagnosis and management of systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* 2021; 80(1):14-25. DOI: 10.1136/annrheumdis-2020-218272.
- Donnelly S, Roake W, Brown S, Young P, Naik H. Wordsworth P. et al. Impaired recognition of apoptotic neutrophils by the C1q/calreticulin and CD91 pathway in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2006; 54: 1543-56. DOI: 10.1002/art.21783.
- Cairns A.P., Crockard A.D., McConnell J.R., Courtney P.A., Bell A.L. Reduced expression of CD44 on monocytes and neutrophils in systemic lupus erythematosus: relations with apoptotic neutrophils and disease activity. *Ann. Rheum. Dis.* 2001; 60: 950-5. DOI: 10.1136/ard.60.10.950.
- Alves C.M., Marzocchi-Machado C.M., Louzada-Junior P., Azzolini A.E., Polizello A.M. de Carvalho I.F. et al. Superoxide anion production by neutrophils is associated with prevalent clinical manifestations in systemic lupus erythematosus. *Clin. Rheumatol.* 2008; 27: 701-8. DOI: 10.1007/s10067-007-0768-x.
- Gupta S., Kaplan M.J. The role of neutrophils and NETosis in autoimmune and renal diseases. *Nat. Rev. Nephrol.* 2016; 12:4 02-13.

- DOI: 10.1038/nrneph.2016.71.
39. Bashant K.R., Aponte A., Randazzo D., Sangsari P.R., Wood A., Bibby J.A. et al. Proteomic, biomechanical and functional analyses define neutrophil heterogeneity in systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* 2021; 80: 209–18. DOI: 10.1136/annrheumdis-2020-218338.
 40. Klopff J., Brostjan C., Eilenberg W., Neumayer C. Neutrophil extracellular traps and their implications in cardiovascular and inflammatory disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22(2):559. DOI: 10.3390/ijms22020559.
 41. Palanichamy A., Bauer J., Yalavarthi S., Meednu N., Barnard J., Owen T., Cistrone C., Bird A., Rabinovich A., Nevarez S. Neutrophil-mediated IFN activation in the bone marrow alters B cell development in human and murine systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 2014; 192: 906–18. DOI: 10.4049/jimmunol.1302112.
 42. Gestermann N., Di Domizio J., Lande R., Demaria O., Frasca L., Feldmeyer L., Di Lucca J., Gilliet M. Netting neutrophils activate autoreactive B cells in lupus. *J. Immunol. Baltim. Md.* 2018; 200: 3364–71. DOI: 10.4049/jimmunol.1700778.
 43. Leffler J., Gullstrand B., Jönsen A., Nilsson J.Å., Martin M., Blom A.M., Bengtsson A.A. Degradation of neutrophil extracellular traps co-varies with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* 2013; 15: R84. DOI: 10.1186/ar4264.
 44. Kahlenberg J.M., Carmona-Rivera C., Smith C.K., Kaplan M.J. Neutrophil extracellular trap-associated protein activation of the NLRP3 inflammasome is enhanced in lupus macrophages. *J. Immunol.* 2013; 190: 1217–1226. doi.org/10.4049/jimmunol.1202388.
 45. Mistry P., Nakabo S., O’Neil L., Goel R.R., Jiang K., Carmona-Rivera C., Gupta S., Chan D.W., Carlucci P.M., Wang X. et al. Transcriptomic, epigenetic, and functional analyses implicate neutrophil diversity in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019; 116: 25222–8. DOI: 10.1073/pnas.1908576116.
 46. Safi R., Al-Hage J., Abbas O., Kibbi A-G., Nassar D. Investigating the presence of neutrophil extracellular traps in cutaneous lesions of different subtypes of lupus erythematosus. *Exp. Dermatol.* 2019; 28:1348–52. DOI: 10.1111/exd.14040.
 47. O’Neil L.J., Kaplan M.J., Carmona-Rivera C. The role of neutrophils and neutrophil extracellular traps in vascular damage in systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Med.* 2019; 8:1325. DOI: 10.3390/jcm8091325.
 48. Smith C.K., Vivekanandan-Giri A., Tang C., Knight J.S., Mathew A., Padilla R.L. et al. Neutrophil extracellular trap-derived enzymes oxidize high-density lipoprotein: an additional proatherogenic mechanism in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* 2014; 66:2532–44. DOI: 10.1002/art.38703.
 49. Wright H.L., Moots R.J., Edwards S.W. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2014; 10:593–601. DOI: 10.1038/nrrheum.2014.80.
 50. Elkouss K.B. Poking holes in rheumatoid joints. *Sci. Transl. Med.* 2013; 5:209fs239. DOI: 10.1126/scitranslmed.3007515.
 51. Romero V., Fert-Bober J., Nigrovic P.A., Darrach E., Haque U.J., Lee D.M. et al. Immune-mediated pore-forming pathways induce cellular hypercitrullination and generate citrullinated autoantigens in rheumatoid arthritis. *Sci. Transl. Med.* 2013; 5: 209ra150. DOI: 10.1126/scitranslmed.3006869.
 52. Corsiero E., Bombardieri M., Carlotti E., Pratesi F., Robinson W., Migliorini P. et al. Single cell cloning and recombinant monoclonal antibodies generation from RA synovial B cells reveal frequent targeting of citrullinated histones of NETs. *Ann. Rheum. Dis.* 2016; 5:1866–75. DOI: 10.1136/annrheumdis-2015-208356.
 53. Dwivedi N., Upadhyay J., Neeli I., Khan S., Pattanaik D., Myers L. et al. Felty’s syndrome autoantibodies bind to deiminated histones and neutrophil extracellular chromatin traps. *Arthritis Rheum.* 2012; 64:982–92. DOI: 10.1002/art.33432.
 54. Pratesi F., Dionisi I., Tommasi C., Alcaro M.C., Paolini I., Barbetti F. et al. Antibodies from patients with rheumatoid arthritis target citrullinated histone 4 contained in neutrophils extracellular traps. *Ann. Rheum. Dis.* 2014; 73:1414–22. DOI: 10.1136/annrheumdis-2012-202765.
 55. Carmona-Rivera C., Carlucci P.M., Moore E., Lingampalli N., Uchtenhagen H., James E. et al. Synovial fibroblast-neutrophil interactions promote pathogenic adaptive immunity in rheumatoid arthritis. *Sci. Immunol.* 2017; 2. DOI: 10.1126/sciimmunol.aag3358.
 56. Chapman E.A., Lyon M., Simpson D., Mason D., Beynon R.J., Moots R.J. et al. Caught in a trap? Proteomic analysis of neutrophil extracellular traps in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Front Immunol.* 2019;10. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00423.
 57. Rother N., Pieterse E., Lubbers J., Hilbrands L., van der Vlag J. Acetylated histones in apoptotic microparticles drive the formation of neutrophil extracellular traps in active lupus nephritis. *Front Immunol.* 2017; 8:1136. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01136.
 58. Lood C., Blanco L.P., Purmalek M.M., Carmona-Rivera C, De Ravin S.S., Smith C.K. et al. Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. *Nat. Med.* 2016; 22:146–53. DOI: 10.1038/nm.4027.
 59. Alemán O.R., Mora N., Cortes-Vieyra R., Uribe-Querol E., Rosales C. Differential use of human neutrophil Fcγ receptors for inducing neutrophil extracellular trap formation. *J. Immunol. Res.* 2016: 2908034. DOI: 10.1155/2016/2908034.
 60. Demoruelle M.K., Bowers E., Lahey L.J., Sokolove J., Purmalek M., Seto N.L. et al. Antibody responses to citrullinated and noncitrullinated antigens in the sputum of subjects with rheumatoid arthritis and subjects at risk for development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2018; 70: 516–27. DOI: 10.1002/art.40401.
 61. Holers V.M., Demoruelle M.K., Kuhn K.A., Buckner J.H., Robinson W.H., Okamoto Y. et al. Rheumatoid arthritis and the mucosal origins hypothesis: protection turns to destruction. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2018; 14: 542–57. DOI: 10.1038/s41584-018-0070-0.
 62. Sur Chowdhury C., Giaglis S., Walker U.A., Buser A., Hahn S., Hasler P. Enhanced neutrophil extracellular trap generation in rheumatoid arthritis: Analysis of underlying signal transduction pathways and potential diagnostic utility. *Arthritis Res. Ther.* 2014; 16: R122. DOI: 10.1186/ar4579.
 63. Pérez-Sánchez C., Ruiz-Limón P., Aguirre M.A., Jiménez-Gómez Y., Arias-de la Rosa I., Ábalos-Aguilera M.C. et al. Diagnostic potential of NETosis-derived products for disease activity, atherosclerosis and therapeutic effectiveness in rheumatoid arthritis patients. *J. Autoimmun.* 2017; 82: 31–40. DOI: 10.1016/j.jaut.2017.04.007.
 64. Kessenbrock K., Krumbholz M., Schönemarker U., Back W., Gross W.L., Gröne H. et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat. Med.* 2009; 15: 623-5. DOI: 10.1038/nm.1959.
 65. Grayson P.C., Kaplan M.J. At the Bench: neutrophil extracellular traps (NETs) highlight novel aspects of innate immune system involvement in autoimmune diseases. *J. Leukoc. Biol.* 2016; 99: 253–64. DOI: 10.1189/jlb.5BT0615-247R.
 66. Nakazawa D., Masuda S., Tomaru U., Ishizu A. Pathogenesis and therapeutic interventions for ANCA-associated vasculitis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2019; 15: 91–101. DOI: 10.1038/s41584-018-0145-y.
 67. Nakazawa D., Tomaru U., Yamamoto C., Jodo S., Ishizu A. Abundant neutrophil extracellular traps in thrombus of patient with microscopic polyangiitis. *Front. Immunol.* 2012; 3: 333. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00333.
 68. Grayson PC, Carmona-Rivera C, Xu L, Lim N, Gao Z, Asare A.L. et al. Neutrophil-related gene expression and low-density granulocytes associated with disease activity and response to treatment in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Rheumatol.* 2015; 67: 1922–32. DOI: 10.1002/art.39153.
 69. Knight J.S., Meng H., Coit P., Yalavarthi S., Sule G., Gandhi A.A. et al. Activated signature of antiphospholipid syndrome neutrophils reveals potential therapeutic target. *JCI Insight.* 2017; 2: e93897. DOI: 10.1172/jci.insight.93897.
 70. Massberg S., Grahl L., von Bruehl M.L., Manukyan D., Pfeiler S., Goosmann C. et al. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat. Med.* 2010; 16: 887-96. DOI: 10.1038/nm.2184.
 71. Sule G., Kelley W.J., Gockman K., Yalavarthi S., Vreede A.P., Banka A.L. et al. Increased adhesive potential of antiphospholipid syndrome neutrophils mediated by beta2 integrin Mac-1. *Arthritis Rheumatol.* 2020; 72: 114-24. DOI: 10.1002/art.41057.
 72. Yalavarthi S., Gould T.J., Rao A.N., Mazza L.F., Morriset A.E., Núñez-Álvarez C. 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; 67: 2990–3003. DOI: 10.1002/art.39247.
 73. Marder W., Knight J.S., Kaplan M.J., Somers E.C., Zhang X., O’Dell A.A. et al. Placental histology and neutrophil extracellular traps in

- lupus and pre-eclampsia pregnancies. *Lupus Sci. Med.* 2016; 3: e000134. DOI: 10.1136/lupus-2015-000134.
74. de Bont C., Stokman M., Faas P., Thurlings R., Boelens W., Wright H., Pruijn G. Autoantibodies to neutrophil extracellular traps represent a potential serological biomarker in rheumatoid arthritis. *J.Autoimmun.* 2020; 113:102484. DOI: 10.1016/j.jaut.2020.102484.
75. Schauer C., Janko C., Munoz L.E., Zhao Y., Kienhöfer D., Frey B. et al. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nat. Med.* 2014; 20: 511-7. DOI: 10.1038/nm.3547.
76. Marwick J.A., Mills R., Kay O., Michail K., Stephen J., Rossi A.G., Dransfield I., Hirani N. Neutrophils induce macrophage anti-inflammatory reprogramming by suppressing NF- κ B activation. *Cell Death. Dis.* 2018; 9: 665. DOI: 10.1038/s41419-018-0710-y.