

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ
ИМ. Д.Г. КНОРРЕ

На правах рукописи

Меламуд Марк Маркович

**АЛАРМИНЫ И АНТИТЕЛА К НИМ В ПАТОГЕНЕЗЕ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ
ВОЛЧАНКИ**

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

1.5.4 – Биохимия

Научные руководители:

Доктор биологических наук, профессор: Бунева В. Н.

Кандидат биологических наук: Ермаков Е. А.

Новосибирск, 2026

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	8
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1. Современные представления об этиологии и патогенезе системной красной волчанки	15
1.1.1. Историческая справка об изучении патогенеза СКВ.....	16
1.1.2. Генетический вклад в патогенез СКВ.....	17
1.1.3. Вклад окружающей среды в патогенез СКВ.....	19
1.1.4. Вклад врождённого иммунитета в патогенез СКВ	21
1.1.5. Вклад приобретённого иммунитета в патогенез СКВ.....	22
1.2. Алармины	25
1.2.1. Внеклеточная ДНК	27
1.2.1.1. Общая внеклеточная ДНК	27
1.2.1.2. Митохондриальная внеклеточная ДНК	30
1.2.1.3. Ядерная внеклеточная ДНК.....	31
1.2.2. Гистоны.....	32
1.2.3. Белок группы высокой подвижности В1 (HMGB1).....	32
1.3. Аутоантитела	35
1.3.1. Роль аутоантител в патогенезе СКВ.....	35
1.3.2. Аутоантитела к аларминам при СКВ	36
1.3.2.1. Аутоантитела к ДНК	37
1.3.2.2. Аутоантитела к гистонам	38
1.3.2.3. Аутоантитела к HMGB1.....	39
1.3.3. Антитела с неканоническими функциями, в том числе каталитические антитела	40
1.3.3.1. Механизмы образования каталитических антител.....	41
1.3.3.2. Каталитические антитела при различных заболеваниях	42
1.3.3.4. Биохимические свойства каталитических антител	44
1.3.3.4. Биологическая роль каталитических антител при СКВ.....	46
1.4. Мышиные модели СКВ.....	47
1.4.1. MRL/lpr	48
1.4.2. Пристан-индуцированная модель.....	49
1.5. Заключение по обзору литературы.....	50
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	52
2.1. Пациенты, лабораторные животные и биологический материал	52
2.1.1. Пациенты и здоровые доноры	52
2.1.2. Мыши	52

2.2. Материалы и оборудование	53
2.3. Методы исследования	53
2.3.1. Методы исследования биологического материала пациентов с СКВ.....	53
2.3.1.1. Выделение и определение концентрации общей внеклеточной ДНК.....	53
2.3.1.2. Определение концентрации ядерной и митохондриальной внеклеточной ДНК	53
2.3.1.3. Определение концентрации HMGB1.....	55
2.3.1.4. Определение концентрации цитокинов.....	55
2.3.1.5. Определение концентрации антител к одно- и двуцепочечной ДНК	55
2.3.1.6. Определение концентрации антител к HMGB1.....	56
2.3.1.7. Выделение иммуноглобулина G из плазмы крови	56
2.3.1.8. Определение ДНК-гидролизующей активности антител.....	57
2.3.1.9. Определение протеолитической активности антител в реакции гидролиза гистонов	57
2.3.1.10. Определение протеолитической активности антител в реакции гидролиза HMGB1	58
2.3.1.11. Определение протеолитической активности антител в реакции гидролиза TNF- α	59
2.3.1.12. Доказательство, что IgG обладают каталитической активностью	59
2.3.2. Методы исследования биологического материала мышей.....	59
2.3.2.1. Моделирование СКВ у мышей путем иммунизации пристаном	59
2.3.2.2. Определение концентрации общей внеклеточной ДНК.....	61
2.3.2.3. Определение концентрации антител к двуцепочечной ДНК	61
2.4. Статистический анализ.....	61
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	63
3.1. Клинико-anamnestические данные пациентов и здоровых доноров	63
3.2. Концентрация аларминов и маркёров нетоза	67
3.2.1. Общая, ядерная и митохондриальная внеклеточная ДНК.....	67
3.2.2. HMGB1	71
3.2.3. Цитруллинированный гистон H3	72
3.2.4. Миелопероксидаза	73
3.2.5. Комбинированные профили маркёров нетоза	74
3.2.6. Связь с клиническими проявлениями заболевания	75
3.2.7. Концентрация цитокинов.....	77
3.2.8. Заключение по разделу.....	79
3.3. Антитела к аларминам.....	80
3.3.1. Анти-ДНК антитела.....	80
3.3.2. Антитела к гистонам	82

3.3.3. Анти-HMGB1 антитела	83
3.3.4. Заключение по разделу	84
3.4. Каталитическая активность антител	85
3.4.1. Доказательство гомогенности выделенных антител	85
3.4.2. ДНК-гидролизующая активность IgG пациентов с СКВ	85
3.4.3. Гистон-гидролизующая активность IgG пациентов с СКВ	94
3.4.4. HMGB1-гидролизующая активность IgG пациентов с СКВ	98
3.4.5. Гидролиз TNF- α IgG пациентов с СКВ	101
3.4.6. Заключение по разделу	102
3.5. Анализ динамики концентраций вкДНК и анти-ДНК антител на экспериментальной модели СКВ мышей	103
3.5.1. Клиническое течение СКВ-подобного состояния у мышей	103
3.5.2. Изменение концентрации общей внеклеточной ДНК в плазме крови	106
3.5.3. Связь между внеклеточной ДНК и массой тела у мышей	106
3.5.4. Изменение концентрации антител к двуцепочечной ДНК в плазме крови	108
3.5.5. Связь между внеклеточной ДНК и антителами к двуцепочечной ДНК	110
4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	113
5. ВЫВОДЫ	114
6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	116
7. ПРИЛОЖЕНИЕ	140

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АНА – антинуклеарные антитела

Анти-дцДНК ат – антитела к двуцепочечной ДНК

Анти-Sm антитела – анти-Смит антитела

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

ВкДНК – внеклеточная ДНК

ВЭБ – вирус Эпштейна-Барра

ГИБП – генно-инженерные биологические препараты

ГКС – глюкокортикостероиды

ГВА – группа высокой активности

ГНА – группа низкой активности

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДНКазы – дезоксирибонуклеаза

ДцДНК – двуцепочечная ДНК

МАЛДИ – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация

МКБ-10 – международная классификация болезней 10-го пересмотра

Мт-вкДНК – митохондриальная внеклеточная ДНК

МПО – миелопероксидаза

НЕТс – нейтрофильные внеклеточные ловушки (от англ. NETs – neutrophil extracellular traps)

РДНК – релаксированная ДНК

РНК – рибонуклеиновая кислота

СКВ – системная красная волчанка

СКФ – скорость клубочковой фильтрации

СсДНК – суперскрученная ДНК

ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания

УФ – ультрафиолетовый

Я-вкДНК – ядерная внеклеточная ДНК

ABCs – возраст-ассоциированные В-клетки

ANCOVA – анализ ковариации (analysis of covariance)

ASDAS-CRP – шкала активности анкилозирующего спондилита с использованием С-реактивного белка (the ankylosing spondylitis disease activity score using C-reactive protein)

ASDAS-ESR – шкала активности анкилозирующего спондилита с использованием скорости оседания эритроцитов (the ankylosing spondylitis disease activity score using erythrocyte sedimentation rate)

BANK – белок-скаффолд В-клеток с анкириновыми повторами

BASDAI – батский индекс активности анкилозирующего спондилита (Bath ankylosing spondylitis activity index)

BLK – В-лимфоидная тирозинкиназа

CAR-T терапия – терапия Т-клетками с химерным антигенным рецептором

CD – кластер дифференцировки

CpG – цитозин-гуаниновые (динуклеотиды)

DAMPs – damage-associated molecular patterns (молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением)

DAS28 – disease activity score 28 (шкала активности заболевания 28)

DBSCAN – density-based spatial clustering of applications with noise (алгоритм кластеризации на основе пространственной плотности наличия шума)

DNase – deoxyribonuclease

DRP-1 – динамин-связанный белок 1

EBNA-1 – Epstein-Barr Nuclear Antigen 1, ядерный антиген вируса Эпштейна-Барра 1

Fc – fragment crystallisable, кристаллизующийся фрагмент (иммуноглобулина)

HMGB1 – high-mobility group protein B1, белок группы высокой подвижности B1

IFN – Interferon, интерферон

IgG – иммуноглобулины класса G

IL – интерлейкин

IRAK1 – Interleukin-1 receptor-associated kinase 1

IRF – Интерферон-регуляторные факторы

LE клетки – Lupus erythematosus клетки, клетки красной волчанки

MDC – Macrophage-derived protein, макрофагальный белок

MHC – Major histocompatibility complex, главный комплекс гистосовместимости

MIP – Macrophage inflammatory protein, макрофагальный воспалительный белок

MTOR – мишень рапамицина у млекопитающих

MyD88 – Myeloid differentiation primary response gene (88)

PAD4 – пептидиларгининдеиминаза 4 (peptidylarginine deiminase 4)

PDC – плазмочитоидные дендритные клетки

PDGF – platelet-derived growth factor, тромбоцитарный фактор роста

PLS-DA – Частичный дискриминативный анализ методом наименьших квадратов (partial least squares – discriminant analysis)

PRR – рецепторы распознавания паттернов (pattern recognition receptors)

PTPN22 – тирозинфосфатаза нерецепторного типа 22

RAGE – рецептор для конечных продуктов гликирования (receptor for advanced glycation endproducts)

SELENA-SLEDAI – национальная оценка безопасности эстрогенов при волчанке – индекс активности системной красной волчанки

SLEDAI-2K – индекс активности системной красной волчанки 2000 (systemic lupus erythematosus disease activity index)

TASL – TLR Adaptor Interacting With Endolysosomal SLC15A4

TFAM – mitochondrial transcription factor A, транскрипционный фактор А митохондрий

TLR – Toll-like receptors, толл-подобные рецепторы

TNF- α – Tumor necrosis factor, фактор некроза опухоли

Treg – регуляторные Т-клетки

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Системная красная волчанка (СКВ) – это тяжёлая мультисистемная аутоиммунная патология, характеризующаяся генерализованным нарушением иммунной толерантности и существенным снижением качества жизни пациентов. Несмотря на относительно невысокую распространенность СКВ в большинстве экономически развитых стран, с начала XXI века повсеместно регистрируется рост общей и первичной заболеваемости СКВ [1]. Это заболевание отличается высокой социально-экономической значимостью, что обусловлено хроническим и неизлечимым характером патологии и необходимостью долгосрочной терапии и медицинского сопровождения таких больных [2, 3]. Кроме того, согласно эпидемиологическим данным, от СКВ чаще страдают женщины репродуктивного возраста [4, 5], что косвенно влияет на демографическую ситуацию во многих странах мира.

Аутоиммунная природа СКВ подразумевает масштабные патологические изменения в иммунной системе на органном, клеточном и молекулярном уровнях. Среди молекул, связанных с патогенезом СКВ, наиболее изучены цитокины и различные аутоантитела [6, 7]. Однако за последние десять лет все больше исследований посвящены изучению роли молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждением (DAMPs, от англ. damage-associated molecular patterns) или аларминов в патогенезе СКВ [8]. К аларминам относят разнообразные молекулы (например, внеклеточная ДНК, гистоны, негистоновый белок HMGB1 и др.), высвобождающиеся из повреждённых клеток и стимулирующие провоспалительный иммунный ответ [9]. Выброс содержимого нейтрофилов с образованием нейтрофильных внеклеточных ловушек (от англ. neutrophil extracellular traps (NETs)) – нетоз – также считается важным источником аларминов при ревматических заболеваниях [10]. Увеличение концентрации циркулирующих аларминов происходит вследствие различных процессов гибели клеток и при неэффективности процессов клиренса этих молекул [11]. По современным представлениям, участие аларминов характерно для патогенеза воспалительных [9] и многих аутоиммунных ревматических заболеваний, включая СКВ [8]. Тем не менее, вклад аларминов в активацию провоспалительных процессов при СКВ и других ревматических заболеваниях еще недостаточно исследован, а данные о концентрации циркулирующих аларминов при таких патологиях зачастую фрагментарны.

Патогенез СКВ неразрывно связан с образованием аутоантител – главным образом, анти-ДНК антител, считающихся высокоспецифичным диагностически значимым

маркёром этого заболевания [12]. Кроме того, при СКВ обнаружены антитела к ядерным белкам (нуклеосома, гистоны, Sm-антиген, малые ядерные рибонуклеопротеины), внеклеточным иммунорегуляторным молекулам (цитокины, С-реактивный белок, компонент комплемента C1q) и ферментам (ДНКазы 1L3, поли(ADP-рибоза)-полимеразы) [7, 13]. Однако механизмы образования таких антител до конца не установлены. Считается, что клеточные компоненты, высвобождаемые при гибели клеток, в том числе путем некроза, могут быть источником аутоантигенов, способствующих нарушению аутоиммунной толерантности и образованию антител [10]. Одним из таких антигенов может выступать внеклеточная ДНК (вкДНК), в том числе в составе ДНК-белковых комплексов [14, 15]. Другие алармины, например, гистоны и негистоновый белок HMGB1, также могут выступать в качестве антигенов [14]. Тем не менее, связь концентрации циркулирующих аларминов с уровнем антител к ним недостаточно изучена при СКВ.

Цель и задачи исследования. Цель настоящей работы заключалась в изучении роли аларминов и аутоантител к ним в патогенезе системной красной волчанки. В ходе работы планировалось решить следующие задачи:

1. Определить и сравнить концентрации аларминов (общая, ядерная, митохондриальная внеклеточная ДНК и негистоновый белок HMGB1) и маркеров некроза (цитруллинированный гистон H3, миелопероксидаза) в плазме пациентов с системной красной волчанкой, здоровых доноров и пациентов с рядом других ревматических патологий, таких как ревматоидный артрит, анкилозирующий спондилит, псориатический артрит; а также оценить их связь с клиническими параметрами болезни.
2. Оценить концентрацию аутоантител к следующим аларминам: ДНК, гистоны и HMGB1 в плазме пациентов с системной красной волчанкой и здоровых доноров; оценить их взаимосвязь с клиническими признаками болезни.
3. Изучить уровень гидролиза антителами пациентов с СКВ и здоровых доноров следующих субстратов: ДНК, гистоны, белок HMGB1, TNF- α ; оценить связь каталитических активностей антител с клиническими характеристиками заболевания.
4. Исследовать концентрацию цитокинов у пациентов с СКВ и здоровых доноров. Оценить взаимосвязь концентрации цитокинов с концентрацией аутоантител и уровнем каталитических активностей.
5. На пристан-индуцированной мышшиной модели СКВ изучить изменения концентрации внеклеточной ДНК и антител к двуцепочечной ДНК с развитием заболевания.

Научная новизна полученных результатов

Впервые проведён обширный анализ аларминов и аутоантител к ним у пациентов с СКВ и на пристан-индуцированной модели СКВ мышей. Одновременно исследованы алармины, маркёры нетоза, цитокины, аутоантитела к аларминам, в том числе антитела с каталитическими активностями. Использование пристан-индуцированной модели СКВ мышей позволило впервые обнаружить динамическую связь между концентрацией внеклеточной ДНК и антителами к двуцепочечной ДНК.

Впервые показано, что у пациентов с СКВ повышение концентрации аларминов намного сильнее ассоциировано с процессом нетоза, по сравнению с другими ревматическими заболеваниями.

Впервые показано, что пациенты с СКВ разделяются на две группы с низким и высоким уровнем ДНК-гидролизующей активности IgG. Продемонстрировано, что эти группы пациентов достаточно сильно отличаются между собой по ряду клинических параметров. Впервые показано, что ДНК-гидролизующая активность IgG у пациентов с СКВ может выполнять положительную роль, так как обнаружена обратная зависимость между уровнем этой активности и тяжестью заболевания, выраженной в индексе SELENA-SLEDAI.

Показано, что IgG пациентов с СКВ обладают протеолитической активностью в отношении гистонов (H1, H2A, H2B и H4), а также впервые в отношении HMGB1. Кроме того, дополнительно показано, что IgG гидролизуют HMGB1 в сайте, расположенном в В-боксе-доме белка, проявляющем провоспалительные свойства.

Впервые продемонстрирована обратная динамика между концентрацией антител к двуцепочечной ДНК и внеклеточной ДНК на пристан-индуцированной мышинной модели СКВ. При исследовании взаимосвязи между антителами к ДНК и вкДНК важно учитывать временной фактор. Это может объяснять неоднородность результатов поперечных исследований корреляции между этими маркерами у пациентов с СКВ.

Практическая значимость работы

Показано, что повышенная ДНК-гидролизующая активность IgG пациентов с СКВ ассоциирована со снижением индекса SELENA-SLEDAI, отражающей тяжесть заболевания. Эта взаимосвязь оказалась сильнее, чем между концентрацией антител к двуцепочечной ДНК, высокоспецифичного маркера СКВ, с индексом SELENA-SLEDAI.

Таким образом, ДНК-гидролизующая активность антител является потенциально эффективным диагностическим маркёром при СКВ.

Установлено, что IgG гидролизуют HMGB1 в его специфической области, В-боксе, ответственном за провоспалительные свойства этого белка, что снижает его аларминные свойства. На базе этих данных могут быть созданы терапевтические моноклональные антитела со схожей активностью.

Положения, выносимые на защиту

1. Изучаемые алармины (общая, ядерная, митохондриальная внеклеточная ДНК и негистоновый белок HMGB1) и маркёры нетоза (цитруллинированный гистон H3, миелопероксидаза) в плазме пациентов с системной красной волчанкой (СКВ) статистически достоверно повышены по сравнению со здоровыми донорами.

2. Комбинированный профиль аларминов и маркёров нетоза пациентов с СКВ, в отличие от пациентов с ревматическими заболеваниями (ревматоидным артритом, анкилозирующим спондилитом и псориатическим артритом), статистически значимо отличается от профиля здоровых доноров.

3. Увеличение концентрации специфических маркёров нетоза (миелопероксидаза, цитруллинированный гистон H3) связано с поражением почек и заболеваниями сердечно-сосудистой системы.

4. Уровень аутоантител ко всем исследуемым аларминам статистически достоверно повышен в плазме пациентов с СКВ, однако их прямую корреляцию с тяжестью заболевания демонстрировали только высокоспецифичные анти-ДНК антитела.

5. IgG пациентов с СКВ гидролизovali такие алармины, как ДНК, гистоны и HMGB1. Выявлена статистически достоверная обратная зависимость уровня ДНК-гидролизующей активности IgG пациентов с СКВ с тяжестью заболевания, выраженного в баллах по SELENA-SLEDAI, что может указывать на положительную роль каталитических антител в патогенезе СКВ.

6. Концентрация канонических высокоспецифичных анти-ДНК антител коррелировала с такими важными провоспалительными цитокинами, как TNF α и IFN α 2, при этом ДНК-гидролизующая активность IgG не коррелировала с цитокинами у пациентов с СКВ, что может свидетельствовать об их неучастии в провоспалительных процессах.

7. Увеличение уровня антител к ДНК вызывало снижение концентрации внеклеточной ДНК в плазме мышей с СКВ-подобным состоянием. Таким образом, эти

показатели изменяются динамически в процессе развития заболевания, что необходимо учитывать при анализе связи этих показателей.

Методология и методы исследования

Концентрацию большинства аларминов, антител к ним и маркёров нетоза определяли методом иммуноферментного анализа; для определения концентрации общей внеклеточной ДНК использовали флуориметрический метод; для определения концентраций ядерной и митохондриальной внеклеточной ДНК использовали цифровую ПЦР; концентрацию цитокинов определяли методом мультиплексного иммуноферментного анализа; антитела IgG выделяли из плазмы методом аффинной хроматографии; уровень каталитической активности определяли методом агарозного или полиакриламидного гельэлектрофореза; визуализацию результатов каталитической активности проводили также методом вестерн-блоттинга.

Публикации и апробация работы

По материалам работы опубликовано 5 печатных публикаций:

1. **Melamud, M. M.**, Ermakov, E. A., Boiko, A. S., Kamaeva, D. A., Sizikov, A. E., Ivanova, S. A., Baulina, N. M., Favorova, O. O., Nevinsky, G. A., Buneva, V. N. Multiplex analysis of serum cytokine profiles in systemic lupus erythematosus and multiple sclerosis // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Т. 23. – № 22. – С. 13829.
2. **Melamud M. M.**, Tolmacheva A. S., Sizikov A. E., Klyaus N. A., Zhuravlev E. S., Stepanov G. A., Nevinsky, G. A., Buneva, V. N., Ermakov, E. A. NETosis-Related Biomarkers in Systemic Lupus Erythematosus, Rheumatoid Arthritis, Psoriatic Arthritis and Ankylosing Spondylitis: A Comparative Study // International Journal of Molecular Sciences. – 2025. – Т. 26. – №. 24. – С. 12127.
3. **Меламуд, М. М.**, Ермаков, Е. А., Толмачева, А. С., Сизиков, А. Э., Кляус, Н. А., Невинский, Г. А., Бунева, В. Н. HMGB1 и анти-HMGB1 антитела при системной красной волчанке и других ревматических заболеваниях // Вестник РГМУ. 2025. №6. С. 170–177. DOI: 10.24075/vrgmu.2025.074
4. **Melamud M. M.**, Ermakov E. A., Tolmacheva A. S., Kostrikina I. A., Sizikov A. E., Nevinsky G. A., Buneva, V. N. Catalytic IgG Antibodies Hydrolyze DNA, Histones, and HMGB1 in Systemic Lupus Erythematosus //International Journal of Molecular Sciences. – 2025. – Т. 26. – №. 19. – С. 9635.

5. **Melamud M. M.**, Ermakov E. A., Tolmacheva A. S., Nevinsky G. A., Buneva V. N. Dynamic Inverse Relationship Between Cell-Free DNA and Anti-dsDNA Antibodies in Experimental SLE Highlights the Potential for Targeted Immunomodulatory Therapy //Pathophysiology. – 2025. – Т. 32. – №. 3. – С. 48.

Работа представлена на 6 российских и международных конференциях:

1. V Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием молодых ученых, аспирантов и студентов «Актуальные проблемы медико-биологических дисциплин» (Саранск, 2021)
2. VIII международная научно-практическая конференция молодых ученых биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов в рамках площадки открытых коммуникаций OPENBIO (Кольцово, 2021)
3. Научная конференция с элементами школы молодых ученых «Молекулярные основы заболеваний: что молекулярная биология может сделать для современной медицины» (Новосибирск, 2021)
4. Bioinformatics of Genome Regulation and Structure / Systems Biology (Новосибирск, 2022)
5. IX международная научно-практическая конференция молодых ученых биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов в рамках площадки открытых коммуникаций OPENBIO (Кольцово, 2022)
6. XII международная научно-практическая конференция молодых ученых биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов в рамках площадки открытых коммуникаций OPENBIO (Кольцово, 2025)

Личный вклад соискателя

Основная часть результатов, представленных в диссертации, получены автором лично, либо при его непосредственном участии. Планирование экспериментов и обсуждение результатов проведено под руководством д.б.н. Буневой В. Н. и к.б.н. Ермаковым Е. А. Работа по сбору биологического материала и анамнеза пациентов с СКВ и другими ревматическими заболеваниями организована к.м.н. Сизиковым А. Э. в отделении ревматологии клиники иммунопатологии НИИФКИ. Работы по определению концентрации цитокинов методом мультиплексного анализа выполнены совместно с НИИ психического здоровья Томского НИМЦ. Работы по определению концентрации ядерной и митохондриальной внеклеточной ДНК методом цифровой ПЦР выполнены совместно с

к.х.н. Степановым Г. А. и Журавлевым Е. С. в лаборатории геномного редактирования ИХБФМ СО РАН.

Структура и объём работы

Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, результатов и обсуждения, списка литературы. Работа изложена на 141 странице, включает 32 рисунков, 15 таблиц и 1 приложение. Список литературы содержит 333 источников.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Современные представления об этиологии и патогенезе системной красной волчанки

В настоящей главе представлено общее представление об этиологии и патогенезе системной красной волчанки (СКВ). На основании данных литературы автор рассматривает информацию через призму различных факторов и систем, вносящих вклад в развитие и прогрессирование заболевания: генетических, средовых, а также факторов врождённого и адаптивного иммунитета. Однако перед углублённым анализом патогенеза необходимо охарактеризовать СКВ как нозологическую единицу.

Системная красная волчанка (M32 по Международной классификации болезней 10-го пересмотра (МКБ-10)) представляет собой диффузное системное аутоиммунное заболевание, что следует из её названия. Как и для большинства заболеваний ревматологического спектра, этиология и патогенез СКВ остаются до конца неизученными, однако с каждым годом объём знаний о них неуклонно возрастает. На клеточно-молекулярном уровне СКВ характеризуется выраженным вовлечением как врождённого, так и адаптивного иммунитета, сопровождающимся формированием обширного репертуара аутоантител, некоторые из которых обладают высокой специфичностью для данной патологии. Вследствие своей системной природы СКВ проявляется широким спектром симптомов, включающим: кожные проявления (характерная «бабочковидная» сыпь, фотосенсибилизация, дискоидные высыпания, алопеция и др.); суставные проявления, выражающиеся различными артритам; поражения внутренних органов (почек, сердца, лёгких, нервной системы); общие проявления (лихорадка, потеря массы тела и др.); иные проявления (ксеростомия, ксерофтальмия, нарушения функций желудочно-кишечного тракта, феномен Рейно и др.). В настоящее время данное заболевание остаётся неизлечимым, однако современные терапевтические подходы позволяют достичь стойкой ремиссии и существенно улучшить качество жизни пациентов. На Рисунке 1 представлен клинико-лабораторный «портрет» пациента с СКВ.

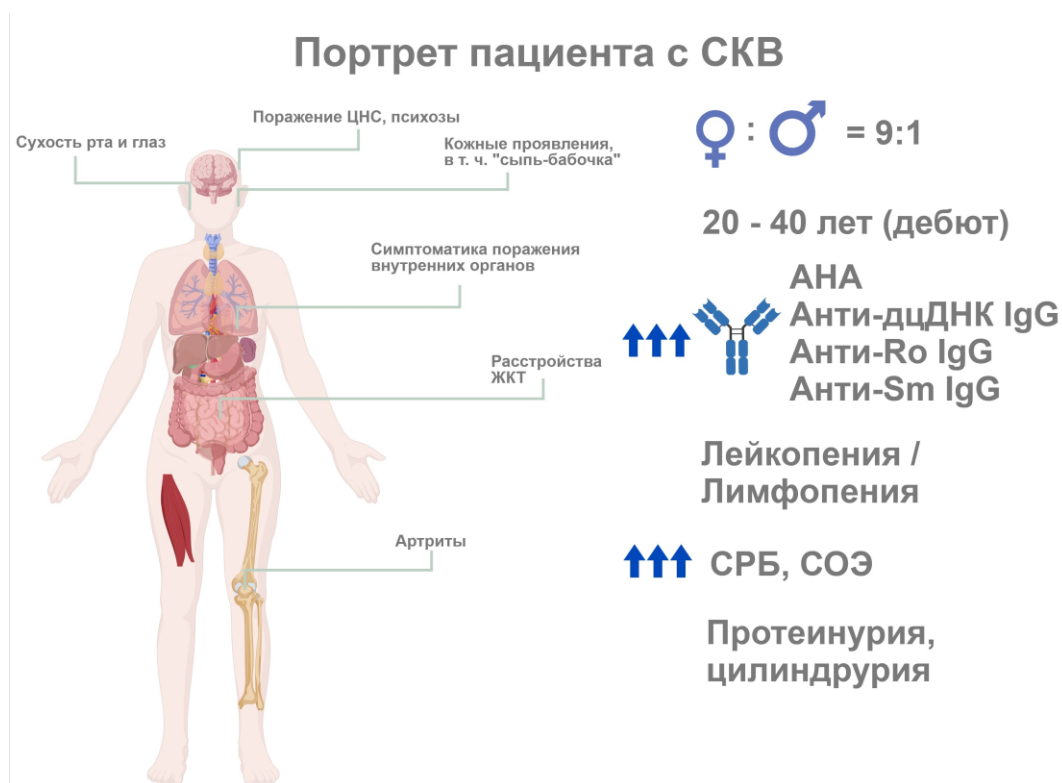


Рисунок 1. Клинико-лабораторный «портрет» пациента с системной красной волчанкой (СКВ). ЦНС – центральная нервная система; ЖКТ – желудочно-кишечный тракт; АНА – антинуклеарные антитела; Анти-дцДНК IgG – иммуноглобулины класса G против двуцепочечной ДНК; Анти-Ro IgG – иммуноглобулины класса G против Ro-антигена (антигена А синдрома Шегрена); Анти-Sm IgG – иммуноглобулины класса G против антигена Смита; СРБ – С-реактивный белок; СОЭ – скорость оседания эритроцитов. *Примечание: не вся симптоматика и изменения в лабораторных показателях могут проявляться одновременно, на изображении представлен собирательный образ из наиболее распространённых клинико-лабораторных признаков.*

1.1.1. Историческая справка об изучении патогенеза СКВ

Системная красная волчанка в настоящее время относится к числу наиболее активно изучаемых аутоиммунных заболеваний. Одной из причин пристального внимания исследователей к данной патологии является её выраженный половой диморфизм: заболевание преимущественно поражает женщин репродуктивного возраста, что представляет собой социально значимую проблему в любом обществе. Кроме того, неизлечимый характер СКВ создаёт существенное бремя как для системы здравоохранения, так и для экономики государства в целом.

Ещё в первой половине XX века имевшиеся на тот момент диагностические методы позволили определить СКВ как системное заболевание, поражающее кожу, суставы, почки, сердце и нервную систему. В 1948 году впервые описана клетка красной волчанки (lupus erythematosus cell, LE-клетка). LE-клетка представляет собой нейтрофил (однако в качестве

фагоцитирующей клетки также могут выступать макрофаг или эозинофил, но в классическом понимании речь идёт о нейтрофилах), фагоцитировавший разрушенное ядро другой клетки. Микроскопическое исследование демонстрирует, что собственное ядро LE-клетки оттеснено к периферии, тогда как центральную часть клетки занимает фагоцитированное ядро. Наличие LE-клеток в крови пациентов в то время служило одним из диагностических критериев СКВ. Впоследствии витральные эксперименты показали, что добавление сыворотки пациентов с СКВ к «нормальным» нейтрофилам индуцирует их трансформацию в LE-клетки [16]. Это способствовало формированию выводов о роли антител в патогенезе СКВ. В 1970-х годах наступил период бурного развития клеточной иммунологии, тогда было установлено влияние Т- и В-клеточного звена на патогенез СКВ [17]. В дальнейшем это позволило выявить хелперную функцию Т-клеток в дифференцировке В-клеток, синтезирующих аутоантитела. В 1990-х годах наступила следующая веха в изучении патогенеза СКВ – открытие толл-подобных рецепторов (TLR) [18]. С открытием этих рецепторов стало очевидно, что различные консервативные последовательности способны стимулировать аутореактивность и приводить к развитию аутоиммунных заболеваний, в том числе СКВ. К молекулам, содержащим такие последовательности, относятся алармины, о которых будет рассказано в разделе [1.2.](#)

1.1.2. Генетический вклад в патогенез СКВ

Поскольку настоящая диссертация посвящена молекулярно-иммунологическим аспектам патогенеза СКВ, генетический вклад будет рассмотрен достаточно кратко.

Перед рассмотрением генов и их вариаций при СКВ необходимо проанализировать потенциальные причины гендерного дисбаланса в популяции пациентов (9 женщин на 1 мужчину). Несмотря на то, что гормоны вносят существенный вклад в данный феномен, их эффект не позволяет полностью объяснить гетерогенность популяции, и вопрос значительного преобладания женщин остаётся окончательно не решённым. Гормональное влияние заключается в том, что эстроген модулирует активность лимфоцитов и плазмацитоидных дендритных клеток, тогда как уровень пролактина в сыворотке пациентов с СКВ повышается [19, 20], Пролактин, в свою очередь, снижает супрессивную активность регуляторных Т-клеток, повышает выживаемость аутореактивных В-клеток, способствует активации плазмацитоидных дендритных клеток (pDC) и др. [20]. Однако объяснение не ограничивается исключительно гормональными факторами. В настоящее время считается, что гены, локализованные на Х-хромосоме, оказывают значительное влияние на развитие СКВ. Косвенным подтверждением этого служит то, что синдром

Клайнфельтера (генотип 47,XXY) встречается у мужчин с СКВ в 14 раз чаще, чем у мужчин без данного заболевания [21]. Хотя механизм связи X-хромосомы с риском развития СКВ остаётся не до конца выясненным, современные данные указывают на возможную роль гена TLR7 в этом процессе [22, 23]. Рецепторы TLR7 распознают одноцепочечные РНК и участвуют в инициации ответа врождённого иммунитета. При этом установлено, что ген TLR7 локализован в области X-хромосомы, которая ускользает от процесса инактивации [23, 24]. Кроме того, на X-хромосоме кодируются также белки, участвующие в сигнальном пути TLR7: TASL (TLR Adaptor Interacting With Endolysosomal SLC15A4) и IRAK1 (Interleukin-1 receptor-associated kinase 1) [24].

Риск развития СКВ у женщин повышается также под влиянием ряда других факторов, которые частично или полностью не могут быть отнесены к генетическим. Раннее менархе (в возрасте до 10 лет) увеличивает вероятность развития СКВ в 2,1 раза, использование постменопаузальных гормонов — в 1,9 раза, а применение оральных контрацептивов — в 1,5 раза [25, 26].

Исследования пациентов с СКВ из одной семьи, а также однояйцевых близнецов, показали влияние генетики в развитие СКВ [27]. Как и при других аутоиммунных заболеваниях, вклад в риск развития СКВ вносят изменения в главном комплексе гистосовместимости (Major Histocompatibility Complex, МНС). Так, повышенный риск развития СКВ ассоциирован с носительством аллеля HLA-DRB1*03. Предполагаемый механизм заключается в том, что структура антигенсвязывающей борозды, кодируемая данным аллелем, способна влиять на эффективность презентации собственных пептидов иммунной системе. Наряду с этим существует также протективный аллель HLA-DRB1*0701, ассоциированный со снижением риска развития СКВ [28].

К числу значимых СКВ-ассоциированных однонуклеотидных полиморфизмов относятся варианты генов, кодирующих белки, задействованные в индукции интерферона I типа (IFN-I) [29, 30, 31]. Интерферон-регуляторные факторы 5 и 7 (IRF5 и IRF7) иницируют транскрипцию IFN- α и других провоспалительных медиаторов. Аллели риска IRF5 и IRF7 ассоциированы с усилением активности IFN I типа у пациентов с повышенным титром антител к ДНК-ассоциированным белкам [29]. ИФН-I играет ключевую роль в патогенезе СКВ. Сигналинг через рецептор IFNAR запускает экспрессию сотен интерферон-стимулируемых генов, регулирующих апоптоз, презентацию антигенов и иммуномодуляцию. Это, в свою очередь, приводит к активации широкого спектра иммунных клеток, включая Т- и В-лимфоциты, и способствует продукции аутоантител [32].

Отдельного рассмотрения заслуживают генетические нарушения белков, участвующих в деградации нуклеиновых кислот, что непосредственно перекликается с темой настоящей диссертации. К избыточной продукции интерферона I типа и других провоспалительных белков может также приводить нарушение процессов деструкции эндогенной ДНК. В расщеплении ДНК нейтрофильных внеклеточных ловушек участвуют две дезоксирибонуклеазы: ДНКаза I и ДНКаза гамма (DNase I Like 3) [33, 34]. Мутации в гене *DNASE1* могут способствовать развитию СКВ, тогда как у пациентов со сдвигом рамки считывания гена *DNASE1L3* (кодирующего DNase I Like 3) описана агрессивная форма заболевания [35]. Нарушения в гене *TREX1*, кодирующем 3'→5'-экзонуклеазу (фермент, удаляющий короткие фрагменты ДНК), также ассоциированы с СКВ [36]. Мутации в гене *TREX1* выявляются примерно у 0,5% пациентов, однако наличие таких мутаций у здорового человека повышает риск развития СКВ в 1,73 раза по сравнению с лицами без данных мутаций [37].

1.1.3. Вклад окружающей среды в патогенез СКВ

Само по себе наличие генетического варианта, модифицирующего риск развития СКВ, не означает, что заболевание обязательно реализуется клинически. Зачастую факторы окружающей среды вносят решающий вклад в патогенез многих заболеваний. В случае СКВ, согласно имеющимся данным, генетическая составляющая обуславливает приблизительно 44% риска развития заболевания [27].

Курение является установленным фактором риска развития СКВ, причём данная связь демонстрирует дозозависимый характер в отношении показателя пачко-лет пациента [38, 39]. Интересно, что умеренное потребление алкоголя, напротив, ассоциировано со снижением риска развития СКВ [40]. Предположительно, данный эффект может быть обусловлен способностью этанола в умеренных дозах ингибировать образование нейтрофильных внеклеточных ловушек (нетоз), что было показано на модели ревматоидного артрита и сопровождалось положительным клиническим эффектом [41].

Согласно эпидемиологическим исследованиям, одной из потенциальных причин развития СКВ может являться вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ). У пациентов с СКВ антитела к ВЭБ и ДНК вируса выявляются чаще по сравнению с популяционной частотой [42, 43, 44]. В настоящее время предложено несколько гипотез, объясняющих связь между ВЭБ и развитием СКВ. Наиболее значимой в контексте настоящей диссертации представляется гипотеза молекулярной мимикрии. Многочисленными исследованиями показано, что

антитела, распознающие ядерный антиген вируса Эпштейна–Барр 1 (EBNA-1), способны также связываться с двуцепочечной ДНК (дцДНК) [45, 46, 47].

Помимо вирусов, интерес также представляют бактерии, причём речь идёт не только о заведомо патогенных микроорганизмах. Некоторые комменсальные микроорганизмы экспрессируют эпитопы, сходные с Ro-антигеном, что может индуцировать образование анти-Ro антител, относительно часто встречающихся при СКВ [48]. Более того, анти-Ro антитела, по-видимому, способны к перекрёстному связыванию с калиевыми каналами hERG-подтипа, вызывая удлинение интервала QTc, что может предрасполагать к развитию аритмий у пациентов с заболеваниями соединительной ткани (преимущественно с болезнью Шёгрена, а также с СКВ) [49]. Эксперименты на мышах с волчаночноподобным фенотипом показали, что перенос некоторых комменсальных бактерий в печень стимулирует образование анти-ДНК антител [50]. В настоящее время установлено, что к комменсальным микроорганизмам человека, потенциально ассоциированным с развитием СКВ, относятся *Enterococcus gallinarum* и *Ruminococcus gnavus* [51]. В условиях здорового организма такие бактерии не представляют угрозы, однако при нарушении слизистого барьера возможна их транслокация, что нередко приводит к неблагоприятным последствиям.

Отдельным фактором риска следует обозначить ультрафиолетовое (УФ) излучение. УФ-свет индуцирует разрывы ДНК, что может приводить к гибели клеток. В процессе клеточной гибели во внеклеточное пространство высвобождается значительное количество аларминов, которые стимулируют развитие иммунного ответа и в конечном итоге могут способствовать неинфекционному аутовоспалению. Тем не менее, связь между экспозицией УФ-излучению и развитием СКВ в настоящее время окончательно не установлена. В исследовании 2023 года показано, что в общей популяции связь между повышенной экспозицией УФ-излучению и развитием СКВ не выявляется, однако такой риск обнаруживается у женщин с повышенной чувствительностью к УФ-свету [52]. В недавнем исследовании 2025 года также продемонстрировано, что минимальная доза УФ-В-спектра, необходимая для формирования эритемы, является независимым фактором риска активности СКВ, причём выявлена отрицательная корреляция: чем ниже уровень фотосенситивности у человека, тем выше вероятность развития СКВ [53].

Важным фактором риска развития СКВ также является влияние некоторых лекарственных средств на метилирование ДНК. Показано, что приём гидралазина (вазодилатора) снижает экспрессию ДНК-метилтрансфераз DNMT1 и DNMT3a — ферментов, участвующих в метилировании ДНК [54, 55]. Снижение уровня метилирования

ДНК способно приводить к активации генов, в том числе опосредующих иммунный гиперответ.

1.1.4. Вклад врождённого иммунитета в патогенез СКВ

Как отмечено выше, одной из ключевых вех в развитии понимания патогенеза СКВ явилось открытие TLR-рецепторов. Основой классификации TLR-рецепторов служит их локализация. Выделяют поверхностные TLR-рецепторы (TLR1, 2, 4, 5, 6, 10) и эндосомальные TLR-рецепторы (TLR3, 7, 8, 9, 11, 12, 13) [56]. Поверхностные TLR распознают главным образом компоненты микробных мембран, тогда как внутриклеточные TLR — нуклеиновые кислоты бактериального и вирусного происхождения, а также, как в случае аутоиммунных заболеваний, собственные нуклеиновые кислоты [56]. Механизмы этих процессов подробно рассмотрены в разделе 1.2.2.

В настоящее время принято считать, что из всех TLR-рецепторов наибольший вклад в развитие СКВ вносят TLR-7 и TLR-9. TLR-7 реагирует на одноцепочечную РНК [57, 58], тогда как TLR-9 преимущественно распознаёт неметилованную ДНК, богатую цитозин-гуаниновыми (СрG) сайтами [58]. Такая ДНК характерна для бактериальных патогенов. Однако СрG-сайты встречаются также и во внеклеточной ДНК (вкДНК), причём как в ядерной (я-вкДНК), так и в митохондриальной (мт-вкДНК). В мт-вкДНК плотность СрG-участков выше (порядка 2,6%), тогда как в я-вкДНК она составляет около 1%, однако, в отличие от мт-вкДНК, в я-вкДНК присутствуют СрG-островки [59]. Исследования показывают, что иммунные комплексы, содержащие нуклеиновые кислоты, достигают внутриклеточных TLR-рецепторов посредством связывания кристаллизующихся фрагментов (Fc-фрагментов) иммуноглобулинов в составе иммунного комплекса с Fc-рецепторами на поверхности клетки с последующим эндоцитозом иммунного комплекса [60]. Эксперименты на мышах подтвердили важную роль TLR7-зависимого пути в синтезе IFN-I. Кроме того, активация TLR7 способствует генерации антител к различным белкам и нуклеиновым кислотам, а также влияет на развитие заболевания в целом [61]. Роль TLR9 представляется более многообразной, поскольку эксперименты на мышинных моделях с дефицитом TLR9 продемонстрировали более тяжёлое течение болезни, что может свидетельствовать о защитной роли данного рецептора [62].

Основными продуцентами IFN-I являются плазмацитоидные дендритные клетки. Однако, помимо них, в интерфероновом патогенетическом пути могут участвовать и другие клетки врождённого иммунитета, например, макрофаги, а точнее их провоспалительный фенотип M1. Доказано, что они тесно связаны как с самим заболеванием, так и с периодами

его обострения [63]. Тромбоциты также играют роль в патогенезе, поскольку они стимулируют продукцию IFN-I дендритными клетками через лиганд CD40 (CD154) [64]. В настоящее время обсуждается и роль нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET, от англ. Neutrophil Extracellular Traps). При образовании NET в процессе нетоза во внеклеточное пространство выбрасывается значительное количество внеклеточной ДНК (вкДНК) как ядерного, так и митохондриального происхождения, а также ассоциированные с ними белки с иммуногенными свойствами, такие как гистоны, белок группы высокой подвижности B1 (HMGB1, от англ. High Mobility Group Box 1) и другие [65, 66]. NET способны стимулировать продукцию IFN-I плазмацитоидными дендритными клетками [67]. Кроме того, NET служат в качестве антигенов для презентации Т-лимфоцитам, что запускает адаптивный иммунный ответ. NET также связаны с повреждением сосудов и тромбозом при СКВ [68].

Следует отметить, что помимо TLR-зависимых, существуют также TLR-независимые пути распознавания иммунных комплексов, содержащих нуклеиновые кислоты. Имеется целый ряд внутриклеточных сенсоров, распознающих РНК и ДНК. Эти альтернативные пути, вероятно, изначально эволюционировали для распознавания вирусных и бактериальных патогенов, однако они также могут активироваться собственными нуклеиновыми кислотами, что приводит к синтезу значительного количества провоспалительных белков. К таким путям, например, относится рецептор AIM2 (от англ. Absent in Melanoma), который распознаёт ядерную ДНК [9]; данный механизм будет рассмотрен в разделе 1.2.1.1.

Большую роль в активации врождённого иммунитета играют алармины, о которых в этой подглаве упоминается лишь вскольз. Более подробный разбор этих молекул приведён в [главе 1.2.](#)

1.1.5. Вклад приобретённого иммунитета в патогенез СКВ

Все перечисленные выше факторы вносят значительный вклад в патогенез СКВ, однако наиболее изученным остаётся влияние адаптивной иммунной системы. Это во многом связано с клиническими проявлениями заболевания, поскольку давно установлено, что основным высокоспецифичным маркёром СКВ являются антинуклеарные антитела (АНА), в том числе антитела к двуцепочечной ДНК (анти-дцДНК) [69]. Несмотря на то что анти-дцДНК антитела представляют собой высокоспецифичный маркёр СКВ, повышение их концентрации обнаруживается не только при данном заболевании, но и при многих других патологиях, например при ревматоидном артрите (РА) [70] или, что менее

ожидаемо, при шизофрении [71]. Однако при СКВ концентрация анти-дцДНК антител значительно выше, чем при других заболеваниях. При СКВ также выявляется выраженная прямая корреляция между концентрацией этих антител и тяжестью заболевания, оцениваемой в индексе SLEDAI-2K (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000) [72].

Изменения в Т-лимфоцитах при СКВ давно и подробно задокументированы. Т-лимфоциты CD (кластер дифференцировки) 4+ играют ключевую роль в патогенезе СКВ и являются обязательным условием для развития этого заболевания [73]. Т-лимфоциты CD4+ осуществляют цитокиновую и иные формы хелперной регуляции, стимулирующей дифференцировку В-клеток, что в конечном итоге приводит к синтезу патологических аутоантител [73]. Для СКВ-ассоциированных Т-лимфоцитов CD4+ характерна активация сигнального пути mTOR (mammalian target of rapamycin). Белок mTOR представляет собой ключевую протеинкиназу, регулирующую фундаментальные клеточные процессы. Для митохондрий СКВ-ассоциированных Т-клеток характерна гиперполяризация, при которой они продуцируют малое количество аденозинтрифосфата (АТФ) [74, 75]. В норме такие митохондрии должны элиминироваться посредством митофагии. Однако при гиперэкспрессии mTOR наблюдается истощение белка DRP-1 (dynamin-related protein 1), ответственного за фрагментацию митохондрий с целью их последующего удаления. Вследствие этого происходит накопление дефектных митохондрий, которые генерируют большое количество активных форм кислорода (АФК), в основном пероксида водорода, и индуцируют окислительный стресс [75, 76]. Окислительный стресс, в свою очередь, дополнительно активирует mTOR, замыкая порочный круг. Описанные изменения могут приводить к поляризации наивных Т-клеток CD4+ в сторону Th17-фенотипа, клетки которого секретируют провоспалительный цитокин интерлейкин-17 (IL-17), способный вызывать повреждение тканей [75].

Известно, что СКВ-ассоциированные Т-клетки CD4+ легче экспрессируют лиганд CD40 (CD154) [77]. CD154 служит костимулирующей молекулой в процессе активации Т-клеточного рецептора молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС). Кроме того, CD154 регулирует функции В-клеток через CD40, экспрессируемый на их поверхности. Такая активация способствует дифференцировке В-клеток в плазматические клетки, продуцирующие аутоантитела. Исследования *in vitro* показали, что добавление антител к CD154 ингибирует гиперпродукцию иммуноглобулинов класса G (IgG) [77]. Также известно, что СКВ-ассоциированные Т-клетки продуцируют меньшее количество интерлейкина-2 (IL-2), что способствует нарушению образования IL-2-зависимых

регуляторных Т-клеток (Treg), выполняющих супрессорную функцию и обеспечивающих иммуносупрессию [78].

Для СКВ характерна лимфопения, то есть общее снижение количества лимфоцитов, однако некоторые субпопуляции Т-клеток, напротив, подвергаются экспансии. Так, например, происходит увеличение субпопуляции Т-фолликулярных хелперов (Tfh), характеризующихся продукцией интерлейкина-21 (IL-21) — цитокина, способствующего дифференцировке антиген-специфичных В-клеток [79]; в контексте СКВ это аутоантиген-специфические клетки. Кроме того, недавно были идентифицированы Т-периферические хелперные клетки (Tph), которые также участвуют в стимуляции дифференцировки В-клеток [80, 81]. У пациентов с СКВ повышена концентрация IFN-I, который, по-видимому, способствует пролиферации Т-периферических хелперных клеток. Что касается Т-киллеров (Т-клеток CD8+), о которых ранее не упоминалось, IFN-I также влияет на их митохондриальную функцию, что приводит к накоплению внутриклеточного дебриса митохондриального происхождения, развитию окислительного стресса и формированию изменённой функциональной активности этих клеток [82].

Анализ изменений активности СКВ-ассоциированных В-клеток выявил генетические варианты, ассоциированные с волчанкой, в таких белках, как В-лимфоидная тирозинкиназа (BLK), белок-скаффолд В-клеток с анкириновыми повторами 1 (B cell scaffold protein with ankyrin repeats 1, BANK1) и тирозинфосфатаза нерецепторного типа 22 (protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22, PTPN22). Гены *BLK* и *BANK1* демонстрируют эпистатическое взаимодействие (комбинация их вариантов повышает риск развития СКВ), а их белковые продукты физически взаимодействуют, формируя новый сигнальный путь в В-клетках, что способствует развитию СКВ. *BANK1*, являясь адаптерным белком, модулирует субклеточную локализацию BLK, оттягивая её от мембраны (в отсутствие *BANK1* до 95% BLK располагается на клеточной мембране), тем самым регулируя сигнальный каскад. Риск-ассоциированные варианты *BLK* связаны со сниженной экспрессией, а варианты *BANK1* — также со сниженной; комбинация этих вариантов способна нарушать гомеостаз регуляторного модуля *BANK1*-BLK. Данные изменения приводят к гиперактивации В-клеток и усилению продукции IgM в ответ на Т-зависимые антигены [83]. Варианты гена *PTPN22* нарушают нормальное подавление активации лимфоцитов (преимущественно Т-клеток), что приводит к гиперреактивности иммунной системы [84].

В-клетки, являясь основными продуцентами антител, не представляют собой монолитную популяцию идентичных клеток. Подобно многим другим клеточным типам,

они представлены разнообразными субпопуляциями. В частности, существует субпопуляция возраст-ассоциированных В-клеток (age-associated B cells, ABCs). В норме, как следует из названия, их численность увеличивается с возрастом. Однако при СКВ количество ABCs заметно возрастает [85, с. 7, 86]. Установлено, что эти клетки тесно связаны с продукцией аутоантител при СКВ. Дифференцировка ABCs опосредована сигналингом через TLR7 и TLR9 (см. главу 1.1.4), что дополнительно подчёркивает роль этих рецепторов в патогенезе СКВ [87]. ABCs способны дифференцироваться в плазматические клетки, продуцирующие антитела к двуцепочечной ДНК (дц-ДНК) или к РНК-связывающим белкам [88]. Долгоживущие плазматические клетки, представляющие собой другой клеточный подтип, синтезируют преимущественно иные аутоантитела, например, анти-Sm (anti-Smith) или анти-Ro. Анти-Sm антитела, наряду с анти-дцДНК антителами, также являются высокоспецифичным маркёром СКВ и направлены против рибонуклеиновых комплексов. Анти-Ro антитела, как отмечалось в разделе 1.1.3, более характерны для болезни Шёгрена, нежели для СКВ, и направлены против внутриклеточного белкового комплекса Ro52/Ro60, ассоциированного с РНК. Эти антитела оказались относительно устойчивыми к иммуносупрессивной терапии, направленной на истощение В-клеток, хотя современные испытания CAR Т-клеточной терапии (Т-клетки с химерным антигенным рецептором), нацеленной на CD19, могут быть более успешными [89]. В отличие от них, циркулирующие преплазматические клетки (плазмобласты) являются источниками антител к дц-ДНК и более чувствительны к анти-В-клеточной терапии, например к белимумабу — моноклональному антителу, связывающему фактор активации В-клеток (BAFF), также известный как стимулятор В-лимфоцитов (BLyS) [90].

В данном разделе были рассмотрены лишь некоторые из нарушений адаптивного иммунитета, характерных для СКВ. Механизмы, посредством которых алармины стимулируют образование аутоантител, будут подробно описаны в главе 1.2. Более детальное обсуждение непосредственно аутоантител и их роли в патогенезе данного заболевания представлено в главе 1.3.

1.2. Алармины

В настоящей главе будут рассмотрены алармины и их роль в патогенезе СКВ. Особое внимание будет уделено тем аларминам, которые являются объектами изучения в данной работе: внеклеточной ДНК, гистонам и ядерному негистоновому белку HMGB1.

Алармины (от англ. alarm — тревога) представляют собой разнородные молекулы, объединённые по своей сигнальной функции, способствующей инициации иммунного

ответа и формированию неинфекционного воспаления [91]. Алармины также известны под названием молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением (DAMPs, от англ. damage-associated molecular patterns). Высвобождение аларминов происходит при повреждении клетки и последующей гибели. Основной функцией этих молекул является привлечение иммунокомпетентных клеток в очаг повреждения с целью его локализации и нейтрализации. В некоторых случаях клетки секретируют данные молекулы при сублетальном стрессе; тогда они обозначаются термином «стрессорины», однако данное название встречается достаточно редко [92, 93].

В фундаментальной работе Roh и Sohn (2018) описано 34 различных алармина [9]; в настоящее время идентифицировано ещё большее их число. В указанном исследовании алармины классифицированы по происхождению на алармины внеклеточного матрикса (бигликан, декорин, фибриноген и др.) и внутриклеточные алармины. Внутриклеточные алармины, в свою очередь, подразделяются на: компоненты цитозоля (мочевая кислота, белки теплового шока (HSP, от англ. heat shock proteins), АТФ и др.); ядерные алармины (ДНК, РНК, гистоны и др.); митохондриальные алармины (митохондриальная ДНК, митохондриальный транскрипционный фактор А (TFAM, от англ. mitochondrial transcription factor A), формилпептид и др.); а также алармины эндоплазматического ретикулума, секреторных гранул и плазматической мембраны [9].

Рецепторами для подавляющего большинства аларминов являются TLR. В контексте настоящей диссертации особую значимость представляют TLR2, TLR4 и TLR9. TLR2 и TLR4 выступают рецепторами для гистонов и HMGB1 — аларминов, изучаемых в данной работе. TLR9 служит рецептором как для ядерной, так и для митохондриальной внеклеточной ДНК [9]. Кроме того, некоторые алармины, например HMGB1, способны взаимодействовать с рецептором конечных продуктов гликирования (RAGE, от англ. Receptor for Advanced Glycation End-products) [94]. Рецептор RAGE является центральным звеном в трансформации «клеточного дебриса» в провоспалительный ответ. Связывание лигандов с RAGE активирует ряд сигнальных путей, которые в конечном итоге приводят к усилению синтеза таких провоспалительных цитокинов, как IL-1 β , IL-6 и TNF- α [95]. Более подробно роль указанных аларминов и рецепторов в патогенезе СКВ будет рассмотрена в следующих главах.

1.2.1. Внеклеточная ДНК

Аутоантитела к двуцепочечной ДНК (дц-ДНК) являются высокоспецифичным маркёром СКВ. После того, как стало очевидно, что различные внеклеточные молекулы, включая нуклеиновые кислоты, способны проявлять иммуногенные свойства, возникло предположение о том, что внеклеточная ДНК (вкДНК) может стимулировать образование анти-дцДНК аутоантител при СКВ. Однако простота этой гипотезы столкнулась с противоречивыми экспериментальными данными: попытки выявить ассоциации между концентрацией вкДНК в крови и уровнем анти-дцДНК антител иногда давали положительный результат [96], а иногда – нет [97]. Это связано с крайней нестабильностью концентрации вкДНК в крови. Она может резко, но кратковременно возрастать при физической нагрузке [98], стрессе [99] и других физиологических состояниях. Кроме того, вкДНК характеризуется очень коротким периодом полувыведения — от 15 мин до 2 ч [100, 101, 102], а согласно современным уточнённым данным, около 24,2 мин [103]. Одним из механизмов элиминации ДНК является её расщепление нуклеазами с последующим выведением мелких фрагментов из организма [104]. Это позволяет предположить, что антитела, обладающие сходными свойствами, также могут участвовать в этом процессе.

Увеличение времени циркуляции вкДНК в организме, по-видимому, достигается за счёт образования комплексов с различными белками, в том числе с другими аларминами. Для ядерной вкДНК (я-вкДНК) такими белками являются гистоны и HMGB1, а для митохондриальной вкДНК (мт-вкДНК) — TFAM. Подобные комплексы характеризуются не только более длительным присутствием в кровотоке, но и повышенной иммуногенностью вследствие одновременного наличия множества потенциальных аутоантигенов. Кроме того, увеличению времени полувыведения вкДНК способствует также снижение активности ДНКаз при СКВ.

1.2.1.1. Общая внеклеточная ДНК

Понятие «общая внеклеточная ДНК» является скорее техническим, нежели биологическим, поскольку по своему происхождению внеклеточная ДНК может быть либо ядерной, либо митохондриальной. Однако в большинстве исследований такое разделение не требуется, исходя из методологических соображений, в связи с чем используется термин «общая вкДНК».

Несмотря на то, что связь между концентрацией общей внеклеточной ДНК (вкДНК) и антителами к двуцепочечной ДНК (анти-дцДНК) выявляется не всегда, большинство

исследований демонстрируют повышение концентрации общей вкДНК у пациентов с СКВ по сравнению со здоровыми донорами [96, 105, 106, 107, 108]. Помимо различий в концентрации, вкДНК пациентов с СКВ отличается от таковой у здоровых доноров также по размеру фрагментов. Установлено, что у здоровых доноров наиболее часто встречаемая длина вкДНК составляет приблизительно 160–169 пар оснований (п.о.) [109], при этом фрагменты длиннее 2000 п.о. не наблюдаются [110]. У пациентов с СКВ распределение фрагментов по длине имеет, по-видимому, два часто встречаемых диапазона: 153–198 и 300–599 п.о. [111]. Однако остаётся до конца не выясненным, в какой степени всё это разнообразие вкДНК участвует в патогенезе СКВ. В одних исследованиях указывается, что вкДНК, независимо от длины фрагментов, прямо коррелирует с активностью заболевания [111]. В других сообщается, что корреляцию с активностью заболевания демонстрируют лишь короткие фрагменты (менее 115 п.о.), причём популяция таких фрагментов обогащена фракциями, связывающимися с IgG [112]. В то же время, некоторые исследования вообще не обнаруживают какой-либо связи [97].

Большинство внеклеточной ДНК (вкДНК), циркулирующей в кровотоке, образуется в результате программируемых типов клеточной гибели. При апоптозе, как правило, формируются фрагменты ДНК размером 180 пар оснований (п.о.) и менее, тогда как при некрозе образуется значительное количество крупных фрагментов размером 10 000 п.о. и более [112]. Фрагменты ДНК короче 115 п.о. составляют основную часть популяции ДНК, связывающейся с IgG, и они защищены, скорее всего, от действия нуклеаз. Следовательно, каталитические антитела, обладающие ДНК-гидролизующей активностью (подробно рассматриваемые в разделе 1.3.3), могут играть положительную роль за счёт конкурентного связывания с субстратом и его последующего гидролиза.

Ещё одним известным типом программируемой клеточной гибели, сопровождающимся высвобождением в кровоток большого количества ДНК, является нетоз. Нетоз представляет собой процесс, при котором нейтрофилы образуют внеклеточные ловушки (NET) для борьбы с патогенами. Каркас NET представляет собой сеть из ДНК, различных белков, включая гистоны, HMGB1, а также антимикробные пептиды [113]. У здоровых людей NET обычно быстро деградируют под действием ДНКазы I. У пациентов с СКВ деградация NET снижена. Это может быть обусловлено действием ингибиторов ДНКазы I, поскольку известно, что их активность повышается при СКВ [34], а также генетическим влиянием на ДНКазы. Кроме того, мыши с дефицитом ДНКазы I способны спонтанно развивать волчаночноподобный фенотип [114]. Дополнительной причиной увеличения времени циркуляции NET в организме при СКВ могут служить анти-NET

антитела, которые защищают их от действия ферментов [115]. На основании этого можно предположить, что антитела с каталитической активностью также могут связываться с NET и способствовать их деградации, что потенциально свидетельствует об их положительном влиянии.

Кроме того, в процессе нетоза происходит выброс большого количества окисленной ДНК. Такая ДНК содержит повышенные уровни 8-оксо-2'-дезоксигуанозина (8-оксо-dG) [116]. Известно, что окисленная ДНК менее подвержена деградации нуклеазами, что может приводить к патологическому накоплению внеклеточной ДНК (вкДНК) [117].

Исследования демонстрируют, что внеклеточная ДНК (вкДНК) распознаётся ДНК-рецепторами и обладает иммуностимулирующим действием [118]. Как было описано ранее в разделе 1.1.5, антитела к двуцепочечной ДНК (дц-ДНК) служат одним из основных переносчиков ДНК в клетки при СКВ. Антитела взаимодействуют с Fcγ-рецептором II (FcγRII) на поверхности плазматоидных дендритных клеток, что облегчает эндоцитоз комплекса антитело-ДНК. Данный процесс позволяет ДНК эффективнее связываться с TLR-9 рецепторами, что приводит к активации интерферонового пути и прогрессированию заболевания [69]. Комплексы антитело-ДНК могут также взаимодействовать с тромбоцитами через Fcγ-рецептор IIa, что ведёт к активации тромбоцитов и способствует развитию тромбозов у пациентов с СКВ.

При других ревматологических патологиях, например при ревматоидном артрите, ДНК может образовывать комплексы с IL-26. Такие комплексы являются нерастворимыми и способствуют накоплению вкДНК [119]. Важно отметить, что не вся вкДНК одинаково способствует воспалению: считается, что митохондриальная вкДНК (мт-вкДНК) обладает более выраженным иммуностимулирующим действием по сравнению с ядерной вкДНК (я-вкДНК) [120], о чём будет подробнее изложено ниже.

Основными ферментами, ответственными за деградацию ДНК в кровотоке, особенно ДНК, ассоциированной с NET, являются ДНКазы I и ДНКазы 1L3. При этом сдвиг рамки считывания в гене последней приводит к развитию более агрессивной формы СКВ [35]. Вместе с тем, давно установлено, что антитела также способны гидролизовать ДНК. Впервые такая активность на примере IgG продемонстрирована Шустером с соавт. в 1992 году [121]. С тех пор эта активность неоднократно показана при различных как соматических заболеваниях, так и психических на примере шизофрении [122, 123]. Однако исследователей преимущественно интересовала био- и физико-химические аспекты данного феномена, а не его клиническое значение. Опубликованные на сегодняшний день

работы не позволяют в полной мере ответить на вопрос о влиянии ДНК-гидролизующих антител на клиническое течение заболевания.

1.2.1.2. Митохондриальная внеклеточная ДНК

Считается, что провоспалительный потенциал мт-вкДНК значительно выше, чем я-вкДНК. Этому способствует несколько причин. Во-первых, мт-вкДНК содержит CpG-островки, о которых уже упоминалось в разделе 1.1.4. Это придаёт мт-вкДНК большее сходство с бактериальной ДНК и, следовательно, делает её более иммуногенной [124]. Ещё в 2004 году показано, что введение в суставы мышей мтДНК или бактериальной ДНК, содержащих гипометилированные CpG-последовательности, индуцирует локальное воспаление и развитие артрита, тогда как введение ядерной ДНК не оказывало какого-либо эффекта [125].

Во-вторых, мтДНК локализована в непосредственной близости от дыхательной цепи, вследствие чего её уязвимость к окислительному повреждению возрастает, поскольку митохондриальная дыхательная цепь генерирует значительное количество активных форм кислорода. Из-за чего митохондриальная ДНК характеризуется более высоким уровнем окислительной модификации по сравнению с ядерной ДНК [126].

Как отмечено в разделе 1.2.2.1, нетоз является важной формой клеточной гибели, сопровождающейся высвобождением внеклеточной вкДНК. Согласно современным представлениям, при нетозе в абсолютных количествах высвобождается значительно больше я-вкДНК, однако основную иммуногенную активность проявляет мт-вкДНК.

В настоящее время выделяют три типа нетоза: суицидальный, витальный и витальный митохондриальный [127].

Суицидальный нетоз является классическим вариантом процесса, при котором происходит каскад реакций, приводящий к лизису нейтрофила. В ходе этого процесса высвобождается большое количество активных форм кислорода, а также внеклеточные ловушки, состоящие из ДНК, различных белков с антибактериальной и иммуностимулирующей активностями [127].

Витальный нетоз отличается от суицидального тем, что, как следует из названия, нейтрофилы не погибают, а продолжают функционировать. В процессе витального нетоза происходит экструзия ядерной ДНК с сохранением целостности плазматической мембраны. При этом образовавшиеся безъядерные нейтрофилы сохраняют способность выполнять важные функции, такие как фагоцитоз и хемотаксис [127].

Витальный митохондриальный нетоз открыт в 2009 году [128]. Данный процесс характеризуется высвобождением митохондриальной, а не ядерной ДНК. Витальный митохондриальный нетоз является менее деструктивным для нейтрофилов, поскольку при нём сохраняется целостность ядра [127].

Для мт-ДНК ключевым белком с такими свойствами является митохондриальный транскрипционный фактор А (TFAM, от англ. mitochondrial transcription factor A). TFAM обнаруживается в комплексе с мт-вкДНК, повышая его стабильность [129], и сам обладает свойствами алармина [9].

Основным рецептором для TFAM служит рецептор для конечных продуктов гликирования (RAGE). Эта связь с RAGE сближает TFAM с алармином ядерного происхождения — HMGB1. По-видимому, подобно HMGB1, TFAM способствует облегчению эндоцитоза иммунных комплексов посредством взаимодействия с RAGE [94]. Вслед за этим митохондриальная ДНК может легко связываться с TLR9 и запускать провоспалительный ответ [9].

1.2.1.3. Ядерная внеклеточная ДНК

Несмотря на то, что из текста раздела 1.2.2.2 следует, что мт-вкДНК более иммуногенна, чем я-вкДНК, это утверждение справедливо лишь для «голых» молекул, где значительный вклад вносят CpG-островки в составе мтДНК. Однако ядерная ДНК окружена большим количеством белков, проявляющих аларминную активность: гистоны, HMGB1 и др. Образование комплексов с этими и другими белками способно усиливать иммуногенный эффект я-вкДНК. Подробная характеристика всех перечисленных белков представлена в соответствующих разделах ниже.

Помимо прочего, ядерная вкДНК характеризуется тем, что помимо TLR9 имеет ещё один основной рецептор для связывания — AIM2, локализованный в цитозоле [9]. Хотя при СКВ активация воспалительного пути ядерной ДНК через этот рецептор происходит намного реже, она всё же возможна. Важным отличием AIM2 от TLR9 является то, что для его активации не требуются CpG-мотивы или какие-либо белковые комплексы — достаточно наличия двуспиральной ДНК в цитозоле [130]. В отличие от интерферонового ответа, характерного для пути, опосредованного TLR9, активация AIM2 приводит к пироптозу клетки с высвобождением значительных количеств IL-1 β и IL-18 [130].

1.2.2. Гистоны

Гистоны представляют собой ядерные белки, одной из основных функций которых является упаковка ДНК в структуру, называемую нуклеосомой. Нуклеосома состоит из ДНК, обёрнутой вокруг октамера коровых гистонов (H2A, H2B, H3 и H4). Линкерные гистоны (H1 и H5) участвуют в организации нуклеосом в структуры более высокого порядка [131]. В настоящее время известно, что гистоны могут также проявлять иммуногенную активность, свойственную аларминам. Установлено, что гистоны способны взаимодействовать с TLR2, TLR4, TLR9 и RAGE, инициируя провоспалительный ответ. Показано, что при повреждении печени гистоны могут связываться с рецепторами распознавания паттернов (PRR, от англ. – pattern recognition receptors) и непосредственно индуцировать образование NET за счёт рекрутирования нейтрофилов в очаг поражения [132].

При взаимодействии с PRR на поверхности клеток гистоны способны не только самостоятельно инициировать провоспалительный ответ, но и облегчать прохождение ДНК через плазматическую мембрану. Основными рецепторами для ядерной ДНК являются TLR9 и AIM2, локализованные внутри клетки. Оказавшись внутри клетки, ДНК может запускать провоспалительный ответ. Гистоны также принимают активное участие в этом процессе, взаимодействуя с TLR9, а также с NLRP3, что приводит к активации NLRP3-инфламмосомы и последующей выработке значительных количеств провоспалительных цитокинов, таких как IL-1 β и IL-18 [133].

Нетоз играет важную роль в развитии СКВ. При витальном нетозе происходит гиперцитруллинирование гистонов, за что отвечает пептидиларгининдеиминаза 4 (PAD4) [127]. Цитруллинированные гистоны, особенно H3, наряду с нейтрофильной эластазой человека и миелопероксидазой являются маркёрами нетоза. У пациентов с СКВ обнаруживается повышенный уровень цитруллинированного H3, причём его концентрация имеет прямую корреляцию с уровнем анти-дцДНК антител [134].

1.2.3. Белок группы высокой подвижности B1 (HMGB1)

HMGB1, известный также как амфотерин, является негистонным белком, участвующим в поддержании структуры нуклеосомы и упаковке ДНК в хроматин [135]. Кроме того, HMGB1 способен проявлять аларминную активность и относится к числу ключевых представителей ядерной группы DAMP [9]. HMGB1 состоит из трёх доменов, каждая из которых выполняет свою функцию в реализации аларминной активности данного белка. Схематичное строение HMGB1 представлено на Рисунке 2. Все обозначенные

домены обладают разнообразными функциями, связанными со связыванием ДНК, её упаковкой внутри клеточного ядра, а также рядом других внутриклеточных процессов. Однако в рамках настоящей работы будут описаны только те функции данных доменов, которые имеют отношение к аларминной активности HMGB1.

Схематичное представление субъединиц HMGB1 и их функций в аларминной активности белка

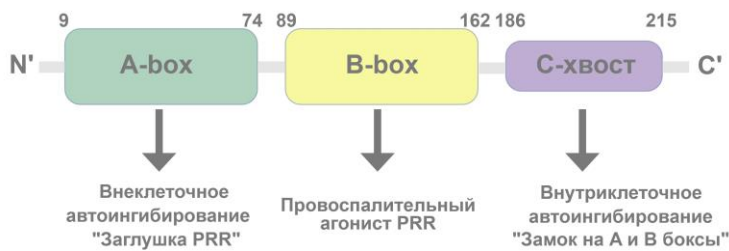


Рисунок 2. Схематичное изображение HMGB1 и функций его доменов. PRR – рецепторы распознавания паттернов

А-бокс отвечает за автоингибирование HMGB1. Данный домен способна связываться с TLR4 и RAGE, однако не активирует провоспалительные пути, что необходимо для предотвращения бесконтрольной инициации иммунного ответа HMGB1 вне клетки по всему организму. В-бокс является непосредственно тем доменом, которая ответственна за провоспалительную активность белка. Он также способен связываться с TLR4 и RAGE, но при этом запускает воспалительные сигнальные пути данных рецепторов [136]. С-хвост также обладает автоингибирующей активностью, но иного характера, нежели А-бокс. С-хвост заряжен отрицательно, тогда как А- и В-боксы — положительно. Благодаря внутримолекулярным взаимодействиям С-хвост способен «сворачивать» белок, закрывая А- и В-боксы от взаимодействия с рецепторами [137]. Кроме того, HMGB1 обладает не только прямой, но и косвенной провоспалительной активностью. Посредством активации RAGE он способен доставлять я-вкДНК внутрь клетки, облегчая тем самым её доступ к TLR9.

HMGB1 в кровотоке подвергается действию различных протеаз. Однако, согласно имеющимся данным, можно предположить, что многие изученные протеазы не оказывают существенного влияния на его провоспалительную активность, а в некоторых случаях даже могут её усиливать. В работе Sowinska с соавт. [138] исследовали действие четырёх протеаз на HMGB1: эластазы нейтрофилов человека, катепсина G, матриксной металлопротеиназы-

3 и дипептидилпептидазы-IV. Установлено, что нейтрофильная эластаза человека удаляет С-хвост HMGB1; второй возможный сайт расщепления расположен в А-боксе. Под действием катепсина G происходит быстрая и полная деградация всего HMGB1. Для матриксной металлопротеиназы-3 характерно удаление С-хвоста; второй предполагаемый сайт гидролиза находится в В-боксе, третий — в А-боксе. Дипептидилпептидаза-IV не расщепляет HMGB1.

В другой работе Lorvellec с соавт. исследовали действие протеазы комплемента C1s на HMGB1 [139]. Установлено, что основным сайтом расщепления является линкер между В-боксом и С-хвостом. Таким образом, показано, что большинство природных протеаз, с которыми HMGB1 может взаимодействовать в организме, гидролизуют линкер между В-боксом и С-хвостом. Разрушение этой части белка способно частично снизить его провоспалительную активность, поскольку в диапазоне аминокислот 150–183, включающем концевую часть В-бокса и линкер между В-боксом и С-хвостом, расположен RAGE-связывающий участок белка [140, 141]. При этом TLR4-связывающая часть белка (аминокислоты 89–108) не подвергается расщеплению большинством природных протеаз, что частично сохраняет его провоспалительную активность.

Более подробная информация о действии протеаз на HMGB1 представлена в Таблице 1. В столбике «Позиция расщепления» Таблицы 1 указаны аминокислотные остатки основных и дополнительных сайтов гидролиза. С тем, в какие домены HMGB1 входят эти аминокислотные остатки можно ознакомиться на Рисунке 2.

Таблица 1. Сайты расщепления HMGB1 различными протеазами и их потенциальный эффект на провоспалительную активность белка.

Протеаза	Позиция расщепления	Домен этой позиции	Потенциальный эффект на провоспалительную активность
Эластаза нейтрофилов человека	V175 или V176 – основной сайт	Линкер между В-боксом и С-хвостом	Уменьшает
	A34 – второй возможный сайт	А-бокс	Нейтральный / увеличивает

Катепсин G	Полное уничтожение до коротких фрагментов	Все домены расщепляются	Полностью снижает
Матриксная металлопротеиназа-3	A161 – основной сайт	Линкер между В-боксом и С-хвостом	Снижает
	L120 – второй возможный сайт	В-бокс	Снижает
	A34 – третий возможный сайт	А-бокс	Нейтральный / увеличивает
Дипептидилпептидаза-IV	Не расщепляет	–	Нейтральный
Протеаза комплемента C1s	K172 – основной сайт	Линкер между В-боксом и С-хвостом	Уменьшает
	K65 – вторичный сайт	А-бокс	Нейтральный / увеличивает
	K128 – вторичный сайт	В-бокс	Снижает

1.3. Аутоантитела

1.3.1. Роль аутоантител в патогенезе СКВ

Аутоантитела играют ключевую роль в патогенезе СКВ. Наиболее распространённые антитела при данном заболевании представлены в таблице 2. Самыми специфичными аутоантителами при СКВ являются антитела к двуцепочечной ДНК и антигену Смита. Кроме того, эти антигены функционально связаны: двуцепочечная ДНК связывается с пептидом, состоящим из аминокислот 83–119 белка SmD1, а Т-клетки, специфичные к данному пептиду, обеспечивают помощь в выработке анти-дцДНК аутоантител [142, 143].

Основное патологическое свойство аутоантител к ДНК при СКВ заключается в их способности образовывать комплексы с нуклеиновой кислотой. Такие комплексы могут откладываться в тканях, обтурировать мелкие сосуды или усиливать иммуногенный эффект

молекулы-антигена. Кроме того, аутоантитела, особенно их лёгкие цепи, могут оказывать повреждающее действие на здоровые клетки. Патологический эффект комплексов аутоантитело-ДНК будет подробно рассмотрен ниже.

При СКВ также встречаются аутоантитела к Ro-, La-антигенам, рибонуклеопротеинам и др. (см. таблицу 2). Однако такие аутоантитела не являются высокоспецифичными для СКВ и выявляются также при других аутоиммунных заболеваниях, например, при болезни Шёгрена. Тем не менее, каждый из этих типов аутоантител вносит свой вклад в состояние пациента с СКВ. Так, анти-Ro антитела, по-видимому, способны к перекрёстному связыванию с калиевыми каналами hERG-подтипа, вызывая удлинение интервала QTс, что может предрасполагать к развитию аритмий [49, 144]. Антифосфолипидные антитела, среди которых волчаночный антикоагулянт является наиболее ярким представителем, могут приводить к повреждению тканей, тромбозу и тромбоцитопении в рамках антифосфолипидного синдрома у некоторых пациентов с СКВ [145, 146].

Таблица 2. Патогенетически важные антигены при СКВ и частота встречаемости аутоантител к ним. SSA – антиген А синдрома Шегрена; SSB – антиген В синдрома Шегрена.

Целевой антиген	Частота встречаемости антител у пациентов с СКВ, %
Ядерные антигены	99
Двуцепочечная ДНК	70
Ro-антиген (SSA)	49
Ядерный антиген Смита	38
La-антиген (SSB)	35
Рибонуклеопротеины	33
Фосфолипиды	21
Рибосомальные Р-белки	10

1.3.2. Аутоантитела к аларминам при СКВ

В настоящее время известно множество аларминов [9]. На многие из них вырабатываются аутоантитела. Однако в данном разделе будут рассмотрены только

аутоантитела против тех молекул, которые являются объектами изучения настоящего исследования: ДНК, гистонов и HMGB1.

1.3.2.1. Аутоантитела к ДНК

Антитела к двуцепочечной ДНК являются высокоспецифичным признаком СКВ (Таблица 2). Логично предположить, что продукция аутоантител к определённому антигену связана с повышенной концентрацией этого антигена. Однако внеклеточная ДНК повышается и при других аутоиммунных патологиях, а также при инфекционных заболеваниях или даже в норме — при различных физиологических состояниях, таких как стресс или физическая активность. В связи с этим возникает вопрос: почему антитела к двуцепочечной ДНК являются высокоспецифичным маркёром для СКВ, хотя служат общей чертой многих других заболеваний и состояний?

Ответ заключается в том, что при СКВ складывается уникальная ситуация, при которой не только образуется избыточное количество «клеточного мусора» — внеклеточной ДНК, ассоциированной с различными белками ядерного и митохондриального происхождения, — но также нарушается работа «мусорщиков», то есть имеет место некачественный клиренс аларминов.

Несмотря на то, что концентрация вкДНК повышается при различных патологиях, это повышение не является одинаковым. Для наглядности можно сопоставить уровень вкДНК при СКВ и при РА в исследованиях, где её измеряли методом количественной ПЦР в реальном времени. Так, средние концентрации вкДНК в плазме при РА составили: 11.15 нг/мл [106], 10.6 [147] и 6.79 нг/мл [148]. Для СКВ соответствующие значения в плазме следующие: 16.31 нг/мл [96], 17.33 нг/мл [106] и 19.06 нг/мл [108].

Кроме того, для СКВ характерно нарушение клиренса ДНК, о чём упоминалось в разделе 1.1.2. В процессе расщепления ДНК участвуют ДНКаза I и ДНКаза 1L3 [33, 34]. Установлено, что мутации в *DNASE1* могут способствовать развитию СКВ. У пациентов со сдвигом рамки считывания гена *DNASE1L3* (кодирующего ДНКазу 1L3) распространена агрессивная форма СКВ [35]. Нарушения в гене *TREX1*, кодирующем 3'-5'-экзонуклеазу — фермент, удаляющий короткие фрагменты ДНК, — также ассоциированы с СКВ [36]. Мутации в гене *TREX1* выявляются примерно у 0,5% пациентов, однако наличие таких мутаций у здорового человека повышает риск развития СКВ в 1,73 раза по сравнению с лицами без данных мутаций [37].

Кроме того, в 2023 году обнаружены субпопуляции В-клеток, продуцирующие антитела, которые одновременно связывают ДНКазу 1L3 и ДНК. Такие В-клетки реализуют два патогенетических механизма одновременно: снижают клиренс ДНК и продуцируют непосредственно антитела к ДНК [149]. Подобные механизмы воздействия на ДНК-гидролизующую систему не характерны для других аутоиммунных заболеваний, и обуславливает высокую специфичность антител к дц-ДНК при СКВ.

Теперь следует представить основные патологические функции антител к ДНК:

1) Образовывать комплексы с ДНК, тем самым «защищая» ДНК от действия ДНКаз [150, 151].

2) Благодаря формированию этих комплексов, ДНК легче проникает в дендритные клетки за счёт взаимодействия антитела с Fc-рецептором на их поверхности, что способствует развитию воспаления [60]. Однако, TLR, распознающие ДНК, локализованы внутри клетки. Образование комплексов с антителами или белками-аларминами, способными взаимодействовать с рецепторами на поверхности клеток, облегчает поступление ДНК в клетку.

3) Комплексы могут накапливаться в почечных клубочках и канальцах, формируя локальный воспалительный ответ с последующим развитием повреждения почек [152]. Этим, в частности, можно объяснить прямую корреляцию между концентрацией антител к дц-ДНК и степенью протеинурии [153].

4) Эти же комплексы способны активировать тромбоциты, что впоследствии может приводить к тромбозам. Интересно, что в исследовании Андриановой с соавт. было показано: комплексы антитело-ДНК активируют тромбоциты значительно сильнее, чем антитела по отдельности [154].

1.3.2.2. Аутоантитела к гистонам

Антитела к гистонам также являются важным маркёром СКВ, хотя целенаправленно их практически никогда не определяют. Однако гистоны H1, H2A, H2B, H3 и H4 входят в «коктейль» мишеней при определении антинуклеарных антител. Антитела к гистонам встречаются при СКВ достаточно часто — по данным различных исследований, от 30% до 40% случаев [155, 156]. Также, как общие антинуклеарные антитела или антитела к двуцепочечной ДНК, антитела к гистонам ассоциированы с активностью заболевания по индексу национальной оценки безопасности эстрогенов при волчанке – индекс активности системной красной волчанки (SLENA-SLEDAI, от англ. Safety of Estrogen in Lupus National

Assessment – Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index) [156]. Помимо этого, концентрация антител к гистонам коррелирует с лихорадкой, потерей массы тела, гематурией, протеинурией, развитием нефропатии, анемией и лимфопенией [156]. Кроме того, повышенная частота выявления антител к гистонам отмечена при таких осложнениях СКВ, как нейропсихиатрическая СКВ и волчаночный нефрит [155].

Значимость анализа на антитела к гистонам возрастает при лекарственно-индуцированной системной красной волчанке (М32.0 по МКБ-10). Уникальность данной формы заключается в том, что при ней крайне редко встречаются антитела к дц-ДНК, тогда как антитела к гистонам выявляются регулярно [157]. По-видимому, комплексы антитело-гистон обладают теми же патогенетическими свойствами, что и комплексы антитело-ДНК (описанные выше) или комплексы антитело-HMGB1 (описанные далее). Образование таких комплексов, вероятно, усиливает аларминные свойства гистонов; кроме того, они также могут откладываться в почках, вызывая их повреждение.

1.3.2.3. Аутоантитела к HMGB1

Несмотря на то, что HMGB1 активно участвует в патогенезе СКВ (см. раздел 1.2.3), существует не так много исследований, посвящённых антителам к этому белку. Возможно, это связано с тем, что HMGB1 не относится к целевым антигенам при СКВ, представленным в таблице 2. Из-за недостаточного количества работ в настоящее время нет даже точного понимания, повышается ли концентрация этих антител при СКВ — как указывается, например, в исследовании Абдулахада с соавт. [158] — или нет, как свидетельствуют данные другого исследования [159]. Прояснить этот вопрос мог бы мета-анализ, однако на данный момент он отсутствует. Тем не менее, в обоих упомянутых исследованиях обнаруживается корреляция между концентрацией антител и активностью заболевания по индексу SELENA-SLEDAI [158, 159].

По-видимому, патологическая роль этих антител заключается в формировании комплексов антиген-антитело с HMGB1. Такие комплексы могут откладываться в почках, приводя к повреждению органов [158]. Поскольку HMGB1 часто циркулирует в комплексе с ДНК, при взаимодействии с анти-HMGB1 антителами могут формироваться комплексы, состоящие из антитела, HMGB1 и ДНК, а также более сложные варианты. Такой комплекс, по-видимому, может обладать повышенной иммуногенностью по сравнению с отдельными его составляющими [160].

1.3.3. Антитела с неканоническими функциями, в том числе каталитические антитела

Антитела в организме выполняют множество разнообразных функций, которые можно разделить на канонические и неканонические. Каноническая функция антител заключается преимущественно в формировании комплекса антиген-антитело-рецептор с последующей инициацией иммунного ответа, однако антителам свойственно также множество других активностей. Все канонические и неканонические активности представлены в Таблице 3. Таблица составлена на основе обзорной работы Ермакова с соавт. [161] и публикации Dimitrov и Lacroix-Desmazes [162]. Поскольку в контексте изучения СКВ особый интерес представляют антитела IgG, данные в таблице 3 приведены только для данного изотипа.

Таблица 3. Канонические и неканонические функции иммуноглобулинов класса G (IgG).

Канонические функции IgG	
<i>Fab-зависимые функции</i>	<i>Fc-зависимые функции</i>
Агглютинация, нейтрализация и экскреция антигенов	Активация системы комплемента
Контроль разнообразия комменсальных и патогенных микроорганизмов	Антителозависимая цитотоксичность
	Антителозависимый фагоцитоз
	Участие в процессинге антигенов путём интернализации через Fc-рецепторы
	Антителозависимая иммуномодуляция
	Влияние на селекцию и выживаемость В-клеток, регуляция апоптоза плазматических клеток
Неканонические функции IgG	
Fab-зависимые функции	Fc-зависимые функции
Разрушение антигенов посредством каталитической активности	Ингибирование транцитозиса инсулина
Прямая инактивация патогенов в отсутствие эффекторных клеток	Антителозависимое усиление инфекции

Кофакторный эффект при нейтрализации патогенов	
Инициация клеточных сигналов посредством рецепторной агонистической активности	
Компенсация дефектов врождённого иммунитета через антицитокиновую и другие активности	
Защита гормонов от протеолитической деградации	
Детоксикация активных форм кислорода посредством оксидоредуктазной активности	
Шаперонная активность	

Все функции разделены на две группы в зависимости от их принадлежности антигенраспознающему фрагменту (Fab) или кристаллизующемуся фрагменту (Fc).

В контексте обсуждения патогенеза СКВ наиболее важной из неканонических функций антител является каталитическая активность. Аутоантитела к дцДНК являются высокоспецифичным маркёром СКВ, при этом способность IgG гидролизовать ДНК продемонстрирована более 35 лет назад [163]. Кроме того, показано, что IgG способны гидролизовать и другой важный компонент нуклеосомы — гистоны [164].

Каталитические антитела связывают антигены с меньшей аффинностью, чем канонические антитела, однако при этом они ускоряют ряд биохимических реакций, включая гидролиз, окисление и другие [162, 165]. Способность к катализу определяется уникальной структурой антигенсвязывающего фрагмента (Fab), формированием структурных мотивов, сходных с ферментами (в том числе каталитических триад), координацией ионов металлов, участвующих в нуклеофильном катализе, а также другими факторами [166, 167, 168]. Каталитические антитела встречаются при многих заболеваниях, о чём подробно будет изложено в разделе 1.3.3.2.

1.3.3.1. Механизмы образования каталитических антител

Согласно литературным данным, известно, как минимум, четыре основных механизма генерации антител с ферментативной активностью (абзимов). Первый механизм связан с врождёнными свойствами самой иммунной системы и обусловлен генами зародышевой линии [169, 170]. В вариабельных доменах антител, кодируемых консервативными зародышевыми генами, обнаружены нуклеофильные сайты (например, каталитические триады сериновых протеаз), способные катализировать химические

реакции [168, 171, 172, 173]. Процесс соматических гипермутаций играет в данном случае второстепенную роль, а каталитическая активность является результатом эволюции иммунной системы [174, 175].

Второй механизм основан на иммунизации стабильными аналогами переходных состояний химических реакций [176, 177, 178]. Поскольку природные переходные состояния нестабильны, для иммунизации используют их устойчивые химические аналоги, имитирующие стереохимию и распределение заряда. Образующиеся антитела комплементарны данному переходному состоянию и, связываясь с субстратом, стабилизируют его, что приводит к каталитическому ускорению реакции [179, 180, 181, 182, 183].

Третий механизм — реактивная иммунизация — предполагает использование высокореактивных гаптенов, которые ковалентно связываются с нуклеофильными остатками В-клеточного рецептора [184, 185, 186]. Это приводит к индукции адаптивного созревания и образованию абзимов, способных гидролизовать сложные белковые мишени [185, 186].

Четвёртый механизм базируется на теории идиотип-антиидиотипической сети Егпе [187]. Если исходным антигеном является фермент, то антитела второго поколения, индуцированные против вариабельной области первых антител, могут нести «внутренний образ» активного центра фермента и, следовательно, обладать каталитической активностью [188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196]. Анализ баз данных показывает, что около 7,4% антител имеют мотивы каталитической триады, однако реализация этой активности усиливается при патологических состояниях, особенно при аутоиммунных заболеваниях [197, 198, 199].

1.3.3.2. Каталитические антитела при различных заболеваниях

В настоящее время накоплена обширная информация о наличии каталитических антител при различных заболеваниях. Впервые каталитическая активность IgG человека продемонстрирована в исследовании Paul с соавт. в 1989 году [163]. В этой работе доказано, что IgG людей с астмой способны гидролизовать вазоактивный интестинальный пептид. Следующей работой явилась публикация Шустера с соавт. 1992 года [121]. В этом исследовании впервые показана способность IgG пациентов с СКВ (что особенно важно в контексте настоящей диссертации) гидролизовать ДНК. За последующие тридцать с лишним лет продемонстрированы многочисленные каталитические активности антител

при различных заболеваниях. Большая часть известной на сегодняшний день информации по данной теме суммирована в таблице 4. Таблица составлена на основе обзора Zhao с соавт. [200] с дополнениями из других источников.

Таблица 4. Некоторые из известных на данный момент каталитических активностей антител при различных состояниях.

Состояние	Тип антител	Активность
Бронхиальная астма	IgG	Гидролиз вазоактивного кишечинального пептида [163]
Здоровые люди	IgG	Пероксидазная и оксидоредуктазная активность [201]
Здоровые люди	IgG	Гидролиз белка Tc24 <i>Trypanosoma cruzi</i> [202]
Здоровые люди (грудное молоко)	sIgA	Рибонуклеазная активность [203]
Здоровые люди (грудное молоко)	IgG	Гистонгидролизующая активность [204]
Здоровые люди (грудное молоко)	IgG	Гидролиз основного белка миелина [204]
СКВ	IgG	Гидролиз ДНК [121]
СКВ	IgG	Гидролиз РНК [205]
СКВ	IgG	Сиалидазоподобная активность [206]
СКВ	IgG	Гидролиз пролин-фенилаланин-аргинин-7-амино-4-метилкумарина [207]
СКВ	IgG	Трипсиноподобная активность [208]
Нейропсихиатрическая СКВ	IgG	Гидролиз ДНК [123]
РС	IgG	Гидролиз ДНК [209]
РС	IgM	Амилолитическая активность [210]
РС	IgG	Гистон-гидролизующая активность [211]
РС	IgG	Гидролиз основного белка миелина [211]
Множественная миелома	IgG	Сиалидазоподобная активность [206]
Множественная миелома (моча)	Белок Бенс-Джонса	Расщепление хромозим TRY [212]
Шизофрения	IgG	Гидролиз ДНК [122]

Тиреоидит Хашимото	Антитела к тиреоглобулину	Гидролиз тиреоглобулина [213]
Лимфопролиферативные заболевания	IgG	Гидролиз ДНК [214]
Гепатит В	IgG	Гидролиз РНК [205]
Макроглобулинемия Вальденстрёма	IgM (Yvo)	Протеолитическая активность [215]
Приобретенная гемофилия	IgG	Гидролиз FVIII [216]
Инфекция <i>Staphylococcus aureus</i>	IgG (от здоровых людей)	Гидролиз внеклеточного фибриноген-связывающего белка <i>St. aureus</i> [217]
Первичная открытоугольная глаукома	Антитела без разделения на типы	Гидролиз основного белка миелина [218]

СКВ – системная красная волчанка; РС – рассеянный склероз

Способность IgG пациентов с СКВ гидролизовать ДНК известна уже более 30 лет, однако до сих пор остаётся невыясненным самый принципиальный вопрос: эти антитела играют положительную или отрицательную роль? В 2001 году проведено исследование Сучкова с соавт. [219] в котором предпринималась попытка оценить клиническую значимость ДНК-гидролизующих антител при СКВ. В этой статье постулируется, что каталитические антитела играют важную роль при СКВ, а их активность положительно ассоциирована с тяжестью заболевания.

Каталитическая активность антител исследовалась не только у пациентов с различными заболеваниями и здоровых доноров, но и на разнообразных животных моделях. У мышей линии C57Bl/6 продемонстрирована ДНК-гидролизующая активность IgG [220]. В частности, показано, что у мышей с экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелитом (модель рассеянного склероза) IgG способны гидролизовать гистоны [164] и микроРНК [221].

1.3.3.4. Биохимические свойства каталитических антител

Каталитические антитела представляют собой иммуноглобулины различных классов, способные не только специфически связывать антиген, но и действовать подобно ферментам [161, 222]. Их фундаментальное биохимическое свойство основано на

способности стабилизировать переходное состояние химической реакции, что согласуется с постулатом Полинга о комплементарности активного центра фермента структуре переходного состояния, а не исходного субстрата [222].

Кинетические параметры абзимов характеризуются умеренной каталитической эффективностью. Абзимы ускоряют реакции в $10\text{--}10^3$ раз по сравнению с некаталитическими процессами, однако их активность, как правило, уступает таковой природных ферментов [222]. Аффинность связывания субстрата варьирует в широких пределах: константы диссоциации (K_D) находятся в диапазоне $10^{-5}\text{--}10^{-8}$ М, что соответствует низкому и среднему сродству [223]. Тем не менее, описаны примеры высокоспецифичного узнавания, например, при гидролизе тиреоглобулина абзимами при тиреоидите Хашимото значение K_M достигало 39 нМ [224].

IgG-антитела пациентов с СКВ демонстрировали ДНК-гидролизующую активность в отношении плазмидной ДНК pUC19 со значениями K_M в диапазоне $4,34\text{--}9,2 \times 10^{-8}$ М и величинами k_{cat} от 14 до 40 мин^{-1} . При гидролизе олигонуклеотида $d(pA)_{10}$ эти показатели составляли: $K_M=1,5 \times 10^{-7}$ М и $k_{cat}=0,2 \text{ мин}^{-1}$ [225]. Характерно, что IgM-антитела обладали более высокой каталитической активностью по сравнению с IgG. Это подтверждается данными при СКВ (обнаружено более высокое значение k_{cat} для IgM в реакции гидролиза РНК-субстратов) и при рассеянном склерозе, где амилолитическая активность IgM сыворотки достигали $1,4\text{--}4,6 \times 10^3 \text{ мин}^{-1}$, тогда как для IgG значение k_{cat} составило $1,7 \times 10^3 \text{ мин}^{-1}$ [226]. Таким образом, каталитические антитела чаще всего менее эффективно катализируют реакции по сравнению с классическими ферментами.

Структурной основой каталитической активности является наличие в вариабельных доменах антител аминокислотных мотивов, гомологичных активным центрам ферментов. Компьютерный анализ 1602 кристаллических структур антител показал, что около 7% из них содержат мотивы классической триады серинового типа (серин, гистидин и аспартат) [162]. Важно отметить, что остатки, формирующие каталитический центр, могут локализоваться не только в гипервариабельных регионах, но и в каркасных участках вариабельных доменов, что расширяет потенциальный репертуар каталитических сайтов [161]. Благодаря этому, каталитические антитела способны катализировать широкий спектр каталитических активностей (более 20 реакций описано в настоящее время) [162].

1.3.3.4. Биологическая роль каталитических антител при СКВ

Как следует из предыдущего раздела, в настоящее время известно множество каталитических активностей, свойственных антителам при СКВ. Однако их роль в патогенезе заболевания остаётся неясной. Патологическая роль анти-ДНК антител во многом сводится к их способности образовывать комплексы с ДНК, это подробно разобрано в разделе 1.3.2.1. Эти патологические механизмы, обусловленные формированием комплекса антитело-ДНК, невозможны в случае каталитических антител, поскольку они воспринимают ДНК как субстрат для расщепления. В данном случае можно допустить обратное: каталитические антитела играют положительную роль, так как, во-первых, уничтожают иммуногенные аутоантигены; во-вторых, конкурируют за связывание с аутоантигенами с обычными антителами, препятствуя тем самым формированию патологических комплексов.

Помимо этого, существуют и другие патологические механизмы действия аутоантител при СКВ, для которых роль каталитических антител уже не столь очевидна. Во-первых, антитела могут наносить прямой цитотоксический урон клеткам за счёт связывания с поверхностными рецепторами с формированием классического ответа, образованием мембраноатакующего комплекса с последующим лизисом клетки, либо опосредовать лизис клетки для естественных киллеров [227]. Во-вторых, антитела способны проникать внутрь ядра при СКВ, фрагментировать ДНК и усиливать или ослаблять проапоптотическую сигнализацию [228]. Что может свидетельствовать в пользу того, что каталитические антитела не несут подобной опасности?

Существует вероятность, что каталитические антитела довольно плохо связываются с Fc-гамма-рецепторами на поверхности клеток. Это связано с тем, что самую высокую активность по гидролизу ДНК проявляет изотип IgG4 [229]. При этом известно, что данный изотип слабо взаимодействует с Fc-рецепторами и не запускает классический путь активации комплемента. Кроме того, IgG4 по большей части рассматриваются как противовоспалительные антитела [230]. Аутоантитела к дцДНК, напротив, обычно относятся к изотипу IgG1, который способен запускать выраженный иммунный ответ через Fc-рецепторы [231].

Естественные антитела представляют собой отдельную популяцию, значительно отличающуюся от основной массы иммуноглобулинов. Во-первых, эти антитела связываются с антигенами, несущими консервативные паттерны. Во-вторых, они являются низкоаффинными, в отличие от большинства антител, ключевая особенность которых —

высокая аффинность. В-третьих, они присутствуют в крови человека постоянно в том или ином количестве, а не появляются лишь в ответ на патогенную инвазию или аутоиммунные процессы. В-четвёртых, по-видимому, эти антитела продуцируются особыми субпопуляциями клеток: В1а-клетками и В-клетками маргинальной зоны, тогда как основной пул классических антител продуцируется плазматическими клетками, дифференцировавшимися из В2-клеток [232].

На основании изложенных выше данных можно предложить, хотя и косвенно аргументированную, принадлежность каталитических антител к естественным антителам. В пользу этого свидетельствует то, что каталитические антитела также обладают способностью гидролизовать различные консервативные молекулы, являются низкоаффинными и встречаются даже у здоровых людей (см. Таблицу 3). Однако связь между каталитическими антителами и естественными антителами до сих пор никак не подтверждена. Всё это приводит к заключению, что каталитические антитела могут крайне слабо взаимодействовать со структурно оформленными молекулярными комплексами, такими как нуклеосомы, в силу своей низкой аффинности, и способны взаимодействовать лишь с молекулами, непосредственно доступными для этого, лишёнными защиты и находящимися во внеклеточном пространстве.

Анализ приведенных данных о свойствах каталитических АТ позволяет утверждать, что каталитические антитела, по-видимому, играют роль универсальных «чистильщиков» клеточного мусора как у здоровых людей, так и при различных патологических состояниях, включая СКВ. Повышение каталитической активности при СКВ (например, ДНК-гидролизующей) является, вероятно, компенсаторной реакцией на увеличение количества продуктов клеточной гибели и не играет прямой роли в патогенезе заболевания. Тем не менее, в данной области остаётся ещё много неясного.

1.4. Мышиные модели СКВ

Некоторые гипотезы, представляющие интерес для исследователей СКВ, невозможно изучить исключительно на пациентах. Это связано, во-первых, с индивидуальным иммунным опытом каждого пациента, что вносит погрешность в результаты; во-вторых, с влиянием проводимой терапии. Пациенты с СКВ получают лечение широким спектром препаратов, воздействующих на иммунную систему: гидроксихлорохином (изначально разработанным как противомаларийное средство, но зарекомендовавшим себя в качестве базовой терапии при СКВ), глюкокортикоидами (преднизолон, метилпреднизолон), биологическими препаратами (белимумаб, ритуксимаб

и др.). В-третьих, существуют этические ограничения, которые не позволяют проводить ряд исследований на пациентах.

В связи с этим некоторые эксперименты возможно проводить только на животных моделях. На данный момент самыми широко используемыми животными моделями СКВ являются две мышинные модели: гуманизированная модель MRL/lpr и пристан-индуцированная модель [233]. Каждая из этих моделей обладает своими преимуществами и недостатками, о чём будет сказано ниже.

1.4.1. MRL/lpr

MRL/lpr является одной из наиболее изученных спонтанных моделей СКВ [234]. Основой этой модели служит дефект в гене *Fas*, приводящий к дисрегуляции В-клеточного звена иммунитета [235]. Эти мыши быстро развивают заболевание, сходное с СКВ, с поражением множества органов, включая головной мозг. Кроме того, в крови этих мышей присутствуют такие серологические маркёры СКВ, как анти-дцДНК антитела и анти-Sm антитела [234].

К основным преимуществам данной модели можно отнести следующее:

- 1) большое сходство с СКВ человека;
- 2) разнообразие клинических проявлений заболевания;
- 3) модель считается более применимой для тестирования терапии [233];
- 4) на этой модели обычно исследуют поражения ЦНС, вызванные СКВ-подобным состоянием [234, 235].

Однако модель не лишена и недостатков:

- 1) создание и поддержание модели является трудоёмкой задачей, что увеличивает стоимость лабораторных животных;
- 2) экспериментальная работа с такими животными может занимать много времени, при этом отклик у некоторых мышей может быть неоднородным из-за генетических факторов, что накладывает ряд ограничений при исследованиях на небольших группах;
- 3) использование гуманизированных моделей сопряжено с бóльшим количеством этических вопросов [233].

1.4.2. Пристан-индуцированная модель

Пристан-индуцированная модель основана на интраперитонеальной инъекции мышам 2,6,10,14-тетраметилпентадекана (пристана). На молекулярном уровне пристан действует как мощный адъювант, который, по до конца не выясненному механизму, потенцирует сигнальный путь TLR7–MyD88, что, в свою очередь, приводит к гиперпродукции IFN-I незрелыми моноцитами. Это нарушает иммунную толерантность и запускает каскад событий, приводящих к развитию СКВ-подобного состояния у мышей [236]. Примечательно, что путь TLR7–MyD88 является незаменимым для данной модели, поскольку мыши с дефицитом как TLR7, так и MyD88 не проявляли СКВ-подобного состояния после инъекции пристана [236].

Как и генетическая модель, пристан-индуцированная обладает как преимуществами, так и недостатками.

Преимущества данной модели:

- 1) модель легко воспроизводима в лабораторных условиях и столь же легко поддерживается;
- 2) развитие СКВ-подобного состояния хорошо прогнозируется и воспроизводится;
- 3) пристан выступает в качестве триггера аутоиммунного ответа, что позволяет изучать на данной модели аутоантитела, а также повреждение почек.

Недостатки модели:

- 1) пристан способствует формированию не столько СКВ-подобного состояния, сколько набора отдельных СКВ-подобных симптомов, что затрудняет проведение комплексных исследований на данной модели;
- 2) являясь токсическим агентом, пристан индуцирует аутоиммунную реакцию, которая, хотя и во многом сходна с таковой у пациентов с СКВ, всё же отличается от неё;
- 3) отсутствие генетических изменений у таких мышей ограничивает возможность их ассоциации с пациентами с СКВ;
- 4) у пристан-индуцированных мышей манифестация заболевания чаще всего происходит через повреждение почек, тогда как у людей это наблюдается не всегда [233].

В настоящей работе использовалась пристан-индуцированная модель, поскольку она обладает рядом ключевых качеств: прогнозируемостью, выраженным аутоантительным ответом, простотой и экономичностью создания и поддержания, а также широкой распространённостью в мировой литературе. Более подробно данная модель будет описана в разделе «Материалы и методы».

1.5. Заключение по обзору литературы

Системная красная волчанка представляет собой многофакторное аутоиммунное заболевание, в патогенезе которого переплетаются генетические, эпигенетические, гормональные и средовые факторы. Ключевую роль в развитии заболевания играет нарушение толерантности к собственным нуклеиновым кислотам и ассоциированным с ними белкам, что приводит к гиперпродукции интерферона I типа, активации как врождённого, так и адаптивного иммунитета и формированию широкого репертуара аутоантител.

Особое место среди молекул, участвующих в инициации и поддержании воспаления при СКВ, занимают алармины — внеклеточная ДНК, гистоны и белок HMGB1. Эти молекулы, высвобождающиеся при клеточной гибели, не только сами обладают иммуностимулирующей активностью, но и, образуя комплексы друг с другом, приобретают повышенную стабильность и иммуногенность. Механизмы распознавания этих комплексов (через TLR, RAGE и другие рецепторы), их накопление в тканях и способность индуцировать образование аутоантител рассматриваются как центральные звенья патогенеза СКВ.

Высокоспецифичным маркёром заболевания являются антитела к двуцепочечной ДНК. Эти аутоантитела, образуя комплексы с ДНК, не только «защищают» её от деградации нуклеазами, но и облегчают её проникновение в клетки, активируют тромбоциты и откладываются в почечных клубочках, способствуя развитию нефрита. Патологический потенциал этих антител во многом определяется их способностью к формированию иммунных комплексов и вовлечению Fc-рецепторных механизмов.

Особый интерес представляет феномен каталитических антител, также обнаруживаемых при СКВ. В отличие от классических аутоантител, они не просто связывают свои мишени, а гидролизуют их, включая ДНК и гистоны. Таким образом, два пула антител к одним и тем же нуклеиновым кислотам — «обычные» и каталитические — могут оказывать

противоположные эффекты: одни закрепляют и усиливают патогенный потенциал внеклеточной ДНК, другие — её разрушают. Природа этого парадоксального сосуществования, соотношение этих двух пулов антител при разной активности заболевания и их интегративная роль в патогенезе СКВ остаются малоизученными. Несмотря на то, что присутствие каталитических антител при СКВ известно уже более трёх десятилетий, их биологическая роль — патогенетическая или, напротив, компенсаторная и защитная — остаётся предметом дискуссий.

Таким образом, понимание молекулярных механизмов, лежащих в основе взаимодействия аларминов, аутоантител (как классических, так и каталитических) и клеток иммунной системы при СКВ, не только приближает нас к пониманию фундаментальных причин заболевания, но и открывает новые мишени для терапевтического вмешательства. Дальнейшие исследования в этой области необходимы для разработки более эффективных и персонализированных подходов к лечению пациентов с СКВ.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Пациенты, лабораторные животные и биологический материал

2.1.1. Пациенты и здоровые доноры

Набор пациентов с ревматическими заболеваниями проводился на базе НИИ фундаментальной и клинической иммунологии (НИИФКИ) СО РАН, Новосибирск, Россия. Диагностирование патологий и клиническая характеристика пациентов проводилась аккредитованными врачами-ревматологами. Критерии включения пациентов в исследование были следующими: наличие информированного согласия на участие в исследовании; возраст старше 18 лет; верифицированный диагноз системная красная волчанка, ревматоидный артрит, псориатический артрит или анкилозирующий спондилоартрит. Критериями исключения являлись: наличие других аутоиммунных заболеваний; активные онкологические заболевания; тяжелые поражения печени и почек; острые воспалительные заболевания за две недели до взятия крови; хирургические вмешательства в течение последних двух месяцев; ВИЧ-инфекция; беременность. Пациенты с СКВ, имеющие волчаночный нефрит, также были исключены.

Набор здоровых доноров проводился на базе института химической биологии и фундаментальной медицины (ИХБФМ) СО РАН, Новосибирск, Россия. Критерии включения здоровых доноров в исследование были следующими: наличие информированного согласия, возраст старше 18 лет. Критерии исключения являлись теми же, что и для пациентов. Исследование одобрено локальным этическим комитетом Института химической биологии и фундаментальной медицины (ИХБФМ) СО РАН (протокол № 3 от 19 июня 2023 г.).

2.1.2. Мыши

Исследование было выполнено на 20 самках мышей линии BALB/c в возрасте 8 недель. Мыши были получены из Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Новосибирск, Россия). Исследование проведено в соответствии с протоколами, одобренными межинститутской комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН №21.11 от 30.05.2014 и директивой 2010/63/EU. На протяжении всего исследования мыши содержались в полностью оснащенном виварии для лабораторных животных в ИХБФМ СО РАН (Новосибирск, Россия). Перед началом исследования все мыши прошли двухнедельный карантин.

2.2. Материалы и оборудование

В настоящей работе использованы следующие реактивы: трис-гидроксиметил-аминометан (Tris), глицин, этилендиаминтетрауксусная кислота динатриевая соль (ЭДТА), NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, CuCl₂, MnCl₂, NiCl₂, ZnCl₂, FeSO₄, NaHPO₄, NaH₂PO₄, KHPO₄, KН₂PO₄, NaHCO₃, Na₂CO₃, акриламид, бисакриламид, мочеви́на (MP Biomedicals, Германия); агароза, бромистый этидий, краситель бромфеноловый синий, краситель ксиленцианол, Тритон X-100, додецилсульфат натрия, цитрат натрия, дитиотреитол (ДТТ), N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (TEMED) (Хеликон, Россия); окрашенные маркеры молекулярной массы белков PageRuler Plus 10-250 кДа, неокрашенные маркеры молекулярной массы белков PageRuler 10-250 кДа (Thermo Scientific, США); диэтилпирокарбонат (Amresco, США); NaOH, HCl, H₂SO₄, H₃PO₄, H₃BO₃, уксусная кислота, изопропанол, бутанол-1, этанол (Реахим, Россия); Coomassie brilliant blue R-250 (Fluka, США).

2.3. Методы исследования

2.3.1. Методы исследования биологического материала пациентов с СКВ

2.3.1.1. Выделение и определение концентрации общей внеклеточной ДНК

Выделение внеклеточной ДНК (вкДНК) из плазмы крови проводили с помощью набора D-Blood-250 (Биолабмикс, Россия) по инструкции производителя. Анализ концентрации общей внеклеточной ДНК проводили с помощью набора Qubit dsDNA High Sensitivity Assay Kit на флуориметре Qubit 4 (Thermofisher Scientific, Германия).

2.3.1.2. Определение концентрации ядерной и митохондриальной внеклеточной ДНК

Для анализа ядерной и митохондриальной вкДНК использовали систему цифровой ПЦР QIAcuity One (Qiagen, Хильден, Германия). Ген человеческой рибонуклеазы Р (RP) использовали в качестве референсного гена для выявления ядерной вкДНК (Таблица 5). Продукт гена RP широко распространен в эукариотических клетках, представлен одной копией, часто используется в качестве внутреннего/положительного контроля в мультиплексных ПЦР-системах и рекомендован Центрами по контролю и профилактике заболеваний США [237]. Ген субъединицы 1 NADH-дегидрогеназы (MT-ND1) использовали в качестве второго референсного гена для выявления митохондриальной

вкДНК (Таблица 5), аналогично работе [238]. В работе использованы зонды, меченые разными флуоресцентными красителями, для обеспечения мультиплексирования и одновременного анализа двух генов.

Таблица 5. Праймеры для детекции ядерной и митохондриальной внеклеточной ДНК.

Ген	Праймер	Последовательность
RP: рибонуклеаза человека Р	Прямой	5'-AGATTTGGACCTGCGAGCG-3'
	Обратный	5'-GAGCGGCTGTCTCCACAAGT-3'
	Зонд	5'-HEX- TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG-BHQ- 1-3'
MT-ND1: NADH- дегидрогеназа субъединица 1	Прямой	5'-GAGCGATGGTGAGAGCTAAGGT-3'
	Обратный	5'-CCCTAAAACCCGCCACATCT-3'
	Зонд	5'-Cy3.5- CCATCACCTCTACATCACCGCCC- BHQ2-3'

Из-за ограниченного объема общей внеклеточной ДНК и ограниченного пространства на ПЦР-планшетах образцы участников отобраны для анализа случайным образом. Реакцию проводили с использованием набора QIAcuity Probe PCR Kit (Кат. № 250102, Qiagen, Хильден, Германия). Конечные концентрации праймеров и зонда составили: 0.3 мкМ прямого праймера, 0.3 мкМ обратного праймера и 0.15 мкМ зонда. Предварительные эксперименты выполняли с использованием специальных 24-луночных планшетов для цифровой ПЦР QIAcuity Nanoplate 26k 24-well (Кат. № 250001, Qiagen, Хильден, Германия) с 26 000 микролунок в каждой лунке. В этих экспериментах определен необходимый объем выделенной внеклеточной ДНК для оптимального обнаружения ядерной и митохондриальной вкДНК. Для скринингового эксперимента по анализу вкДНК во всех образцах использовали 96-луночные пластины для цифровой ПЦР QIAcuity Nanoplate 8.5k 96-well (Кат. № 250021, Qiagen, Хильден, Германия) с 8500 микролунок в каждой лунке. Применяли следующие условия термоциклирования: предциклическая тепловая активация ДНК-полимеразы при 95 °C (3 мин) с последующими 40 циклами денатурации при 95 °C (15 с) и совмещенными отжигом/элонгацией при 60 °C (30 с). Анализ результатов проводили с использованием программы QIAcuity Software Suite (v2.2) (Qiagen, Хильден, Германия). Результаты представляли в следующих единицах концентрации: копий/мл.

2.3.1.3. Определение концентрации HMGB1

Концентрацию HMGB1 определяли методом иммуноферментного анализа с использованием набора Human HMGB1 ELISA Kit (Кат. №: E-EL-H1554, Elabscience, США). Плазму крови для анализа предварительно разводили в 10 раз. Оптическую плотность измеряли на приборе Multiskan™ FC Microplate Photometer (Thermo Fisher Scientific Inc., США) при $\lambda = 450$ нм согласно инструкциям производителей наборов.

2.3.1.4. Определение концентрации цитокинов

Все измерения выполнены на оборудовании Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» Томского национального исследовательского медицинского центра РАН. Концентрацию цитокинов в сыворотке определяли с помощью мультиплексного анализатора MAGPIX® (Luminex, Остин, Техас, США) с использованием набора MILLIPLEX MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel-Premixed 41 Plex, кат. № HCYTMAG-60K-PX41 (Merck Millipore, Дармштадт, Германия). Список используемых сокращений и описание 41 анализируемого цитокина представлены в Таблице П1. Все этапы измерений выполняли в соответствии с рекомендациями производителя. Анализ полученных сигналов проводили в программном обеспечении Luminex xPONENT®. Дальнейший анализ выполняли в программе MILLIPLEX® Analyst 5.1. Концентрация цитокинов выражалась в пг/мл. Для контроля качества проведенного анализа на каждой планшете анализировали контрольные лунки с известной концентрацией цитокинов, поставляемые вместе с набором. Точность внутри анализа (Intra-assay coefficient of variation) не превышала 4.3% для каждого цитокина. Точность между анализами (Inter-assay coefficient of variation) в среднем составил 10.5% и варьировал от 3.5% (для IL-8) до 18.3% (для IL-6). Если полученное значение не попадало в диапазон калибровочной кривой или выходило за пределы двух стандартных отклонений от среднего значения по группе, такое значение считали выбросом и удаляли из выборки. Анализируемые концентрации цитокинов содержали от 0 до 4.3% выбросов. Пропущенные значения исключали из дальнейшего анализа.

2.3.1.5. Определение концентрации антител к одно- и двуцепочечной ДНК

Концентрацию анти-дцДНК IgG определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием набора Vecto-dsDNA-IgG 12x8 A-8656 («Вектор-Бест», Новосибирск, Россия). Концентрацию анти-оцДНК IgG определяли методом ИФА с использованием набора Vecto-ssDNA-IgG 12x8 A-8658 («Вектор-Бест», Новосибирск, Россия). Измерение оптической плотности проводили на планшетном фотометре

Multiskan™ FC (Thermo Fisher Scientific GmbH, Драйайрх, Германия) при длине волны 450 нм в соответствии с инструкциями производителя наборов.

2.3.1.6. Определение концентрации антител к HMGB1

Концентрацию анти-HMGB1-антител определяли с помощью набора ELISA Kit for anti-HMGB1 antibody (Кат. №: AEA399Hu, Cloud-Clone Corp., Китай). Чувствительность данного набора составила 1.17 нг/мл, диапазон измерений — 3.12–200 нг/мл. Участников с концентрацией ниже порога чувствительности считали не имеющими анти-HMGB1-антител. Плазму крови для анализа анти-HMGB1-антител предварительно разводили в 100 раз. Оптическую плотность измеряли на приборе Multiskan™ FC Microplate Photometer (Thermo Fisher Scientific Inc., США) при $\lambda = 450$ нм согласно инструкциям производителей наборов.

2.3.1.7. Выделение иммуноглобулина G из плазмы крови

Кровь пациентов и здоровых доноров собирали в вакуумные пробирки с диоксидом кремния (Shandong Medical Products Factory, Китай) и центрифугировали (2000g, 15 мин) для получения сыворотки. Образцы поликлональных IgG выделяли из сыворотки методом аффинной хроматографии с использованием системы ÄKTA Start (GE Healthcare, США) в соответствии с ранее разработанным протоколом [122, 201, 239], позволяющем получать гомогенные образцы IgG, не содержащие примеси других белков. Сначала сыворотку центрифугировали (7500 × g, 5 мин), разбавляли в соотношении 1:3 буфером А (50 мМ Трис-НCl, pH 7.5 + 150 мМ NaCl) и наносили на колонку HiTrap Sepharose HP Protein G (Cytiva, Швеция), объёмом 1 мл. Посторонние примеси удаляли путём промывания колонки буфером А (8 объёмов колонки), 1% раствором Triton X-100 в буфере А (3 объёма колонки) и буфером А (15 объёмов колонки). Элюцию IgG проводили с использованием 100 мМ Gly-HCl, pH 2.6. Полученные образцы IgG дополнительно очищали методом ВЭЖХ-гель-фильтрации на колонке Superdex 200 HR 10/30 (Cytiva, Швеция), нейтрализовали щелочным буфером (1М Трис-НCl, pH 8.8) и диализовали против 50 мМ Трис-НCl, pH 7.5. Концентрацию IgG определяли спектрофотометрически с использованием прибора BioSpectrometer Kinetic (Eppendorf, Германия). Гомогенность выделенных препаратов IgG проверяли с помощью денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле в градиенте концентрации (4–18%) в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-ПАAG) с последующим окрашиванием 0.01% Кумасси R-250. Анализ проводили как в отсутствие,

так и в присутствии восстанавливающего агента (ДТТ), добавляемого в образцы перед внесением в гель для восстановления дисульфидных связей в молекулах IgG. Полученные гели сканировали с помощью системы гель-документирования Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США).

2.3.1.8. Определение ДНК-гидролизующей активности антител

Уровень ДНКазной активности IgG определяли по степени гидролиза плазмидной ДНК pBluescript (4588 пар оснований, молекулярная масса 2.95 кДа) в соответствии с ранее описанной методикой [122]. Реакционную смесь (10 мкл), содержащую 20 мМ Трис-НСl, pH 7.5, 18 мкг/мл плазмидной ДНК pBluescript, 5 мМ MgCl₂ и 0.1 мг/мл IgG (или эквивалентный объем буфера в контроле), инкубировали при 37 °С в течение 30 мин – 1 ч. Для разделения продуктов гидролиза проводили электрофорез в 1% агарозном геле (150 мА, 80 В). Затем гель окрашивали бромистым этидием и сканировали с помощью системы гель-документирования Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США). Денситометрический анализ электрофореграмм проводили в программе Image Lab 6.0 (Bio-Rad, США). Уровень ДНКазной активности IgG оценивали денситометрически по переходу плазмидной ДНК из суперспиральной формы в релаксированную и более короткие формы ДНК. Результаты выражали в единицах удельной активности: нмоль ДНК/ 1 ч / 1 мг IgG.

2.3.1.9. Определение протеолитической активности антител в реакции гидролиза гистонов

Уровень IgG-зависимой гистон-гидролизующей активности определяли по степени гидролиза гистонов типа II-A (смесь гистонов H1, H2a, H2b, H3 и H4; кат. № H9250, Merck, Дармштадт, Германия) в качестве субстрата в соответствии с ранее описанной методикой [239]. Реакционная смесь (10 мкл) содержала 20 мМ Трис-НСl, pH 7.5, 1 мг/мл смеси гистонов и 0.1 мг/мл IgG (или эквивалентный объем буфера в контрольном образце). Реакционные смеси инкубировали в течение 25 ч при 37 °С. Реакцию останавливали добавлением стоп-буфера, содержащего 50 мМ Трис-НСl, pH 6.8, 10% глицерина, 2% додецилсульфата натрия и 0.025% бромфенолового синего, с последующим замораживанием при –70 °С до проведения анализа. Далее проводили электрофорез в 15% полиакриламидном геле с последующим окрашиванием Кумасси R-250 для визуализации продуктов гидролиза. Электрофореграммы получали с использованием системы гель-документации Gel Doc XR+ (Bio-Rad, Геркулес, Калифорния, США). Уровень гистон-гидролизующей активности IgG определяли денситометрически по снижению интенсивности белковых полос каждого из гистонов с использованием программного

обеспечения Image Lab 6.0 (Bio-Rad, Беркли, Калифорния, США). Результаты представлены в нмоль гистона / 1 ч / 1 мг IgG.

2.3.1.10. Определение протеолитической активности антител в реакции гидролиза HMGB1

Для анализа способности IgG гидролизовать HMGB1 использовали коммерческий рекомбинантный белок HMGB1 (кат. № RPA399Hu01, Cloud-Clone Corp., США), представляющий собой полноразмерный белок (Met1~Glu215) с дополнительным N-концевой гексагистидиновой меткой (с последовательностью MGNHHHHHSGSEF). Реакционная смесь (10 мкл) содержала 20 mM Трис-HCl, pH 7.5, 0.12 мг/мл HMGB1 и 0.1 мг/мл IgG (или эквивалентный объём буфера в контроле). После инкубации в течение 17 ч при 37 °C реакцию останавливали добавлением восстанавливающего стоп-буфера, содержащего 50 mM Трис-HCl, pH 6.8, 100 mM дитиотреитол, 10% глицерина, 2% додецилсульфата натрия и 0.025% бромфенолового синего, с последующим замораживанием при -70 °C до проведения анализа.

Анализ продуктов гидролиза проводили с помощью восстанавливающего 10% SDS-ПААГ с последующим окрашиванием Кумасси R-250. Продукты гидролиза также визуализировали методом Вестерн-блоттинга с использованием двух типов детектирующих антител. В первом случае после трансфера белков на мембрану из поливинилидендифторида, блокирования буфером, содержащим бычий сывороточный альбумин, и промывки, HMGB1 выявляли с помощью кроличьих поликлональных антител к HMGB1, конъюгированных с пероксидазой хрена (HRP), в разведении 1:2150 (кат. № LAA399Hu91, Cloud-Clone Corp., США). Во втором случае для Вестерн-блоттинга использовали мышинные антитела к His-метке, конъюгированные со щелочной фосфатазой, в разведении 1:20000 (клон: AD1.1.10, изотип: IgG1, кат. № MCA1396A, Bio-Rad, США). Для окрашивания блота использовали смесь двух субстратов [5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат (BCIP, #R0822, Thermo Fisher Scientific) и нитросиний тетразолий (NBT, #N6495, Thermo Fisher Scientific GmbH, Германия)] в буфере для щелочной фосфатазы (100 mM Трис-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl и 10 mM MgCl₂). Сканы гелей получали с помощью системы гель-документирования Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США).

Уровень HMGB1-гидролизующей активности IgG определяли денситометрически по снижению интенсивности белковых полос HMGB1 с использованием программного обеспечения Image Lab 6.0 (Bio-Rad, США). Результат представлен в нмоль HMGB1 / 1 ч / 1 мг IgG.

2.3.1.11. Определение протеолитической активности антител в реакции гидролиза TNF- α

Для анализа способности IgG гидролизовать TNF α использовали рекомбинантный активный TNF α (кат. № APA133Hu01, Cloud-Clone Corp., Кати, Техас, США). Реакционную смесь объемом 10 мкл, содержащую 20 mM Трис-HCl, pH 7.5, 0.12 мг/мл TNF α и 0.1 мг/мл IgG (или эквивалентный объем буфера в контрольном образце), инкубировали в течение 17 ч при 37 °C. Реакцию останавливали добавлением восстанавливающего стоп-буфера, после чего продукты гидролиза разделяли с помощью восстанавливающего 10% SDS-ПААГ и окрашивали Кумасси R-250 или методом вестерн-блоттинга, как описано ранее (раздел 2.3.1.10). Для вестерн-блоттинга использовали кроличьи поликлональные антитела к TNF α , конъюгированные с пероксидазой хрена, в разведении 1:2000 (кат. № LAA133Hu91, Cloud-Clone Corp., Кати, Техас, США).

2.3.1.12. Доказательство, что IgG обладают каталитической активностью

Чтобы доказать, что каталитическая активность принадлежит антителам, проведен анализ каталитической активности во фракциях после сорбции IgG на аффинном сорбенте. Эквимольную смесь двух образцов IgG пациентов с СКВ, проявляющих высокую активность в гидролизе ДНК и гистонов (430 мкл, [IgG] = 1.5 мг/мл), наносили на колонку (объемом 1 мл) с rProtein G Sepharose 4FF (Sunresin New Materials Co., Ltd., Сиань, Китай), предварительно уравновешенную TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7.5 + 150 mM NaCl). Собирали фракцию проскока (фракция 1, 1 мл), содержащую несвязавшиеся белки. Затем колонку промыли TBS (10 мл), и IgG элюировали с помощью 100 mM Gly-HCl, pH 2.6 (фракция 2, 1 мл). Полученные фракции нейтрализовали 1 M Tris-HCl, pH 8.8, и диализовали против 50 mM Tris-HCl, pH 7.5. Далее исследовали ДНКазную и гистон-гидролизующую активность в образце эквимольной смеси IgG до хроматографии, а также фракций 1 и 2, как описано выше.

2.3.2. Методы исследования биологического материала мышей

2.3.2.1. Моделирование СКВ у мышей путем иммунизации пристаном

Для определения необходимого размера выборки проведен анализ мощности (G*power analysis). Поскольку в литературе отсутствовали данные о концентрациях вкДНК у мышей, иммунизированных пристаном, в качестве референса использовали данные, полученные у пациентов с СКВ. Согласно большинству исследований концентрации вкДНК у пациентов с СКВ, она была примерно в 4 и более раза выше, чем у здоровых

доноров [96, 105, 106, 147]. На основании опубликованных исследований сделано предположение, что у больных животных будет наблюдаться 4-кратное повышение уровня биомаркеров по сравнению с контролем. Стандартное отклонение оценивали как 50% от среднего значения в каждой группе, что соответствует стандартизированному размеру эффекта (Cohen's d) ≈ 1.41 . При мощности 80% и двустороннем уровне значимости $\alpha = 0.05$ расчет показал, что потребуется 7–9 животных в группе.

Мыши случайным образом разделены на две группы: экспериментальную и контрольную. Экспериментальная группа включала 12 животных, которым вводили 2,6,10,14-тетраметилпентадекан (пристан) (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) для моделирования СКВ-подобного состояния. Однократную внутривбрюшинную инъекцию пристана объемом 500 мкл выполняли, как и в других аналогичных экспериментах [240]. Контрольная группа включала 8 животных, которым вводили раствор PBS (500 мкл, внутривбрюшинно, однократно). Быстрая потеря массы тела более чем на 20% в течение недели наблюдения считалась гуманной конечной точкой, требующей эвтаназии. Однако ни одно животное за время эксперимента не достигло этого критерия.

Дизайн эксперимента показан на Рисунке 3. Кровь объемом 200 мкл получали из ретроорбитального синуса в капиллярные пробирки для сбора крови Microvette 200 EDTA K3E (Sarstedt AG & Co, Нюмбрехт, Германия). Такой подход позволил многократно получать кровь от одних и тех же животных для наблюдения динамических изменений показателей. Все манипуляции выполнял опытный исследователь для минимизации стресса у животных. Лидокаин использовали в качестве местного офтальмологического анестетика. Плазму крови получали путем центрифугирования ($2000 \times g$, 15 мин).

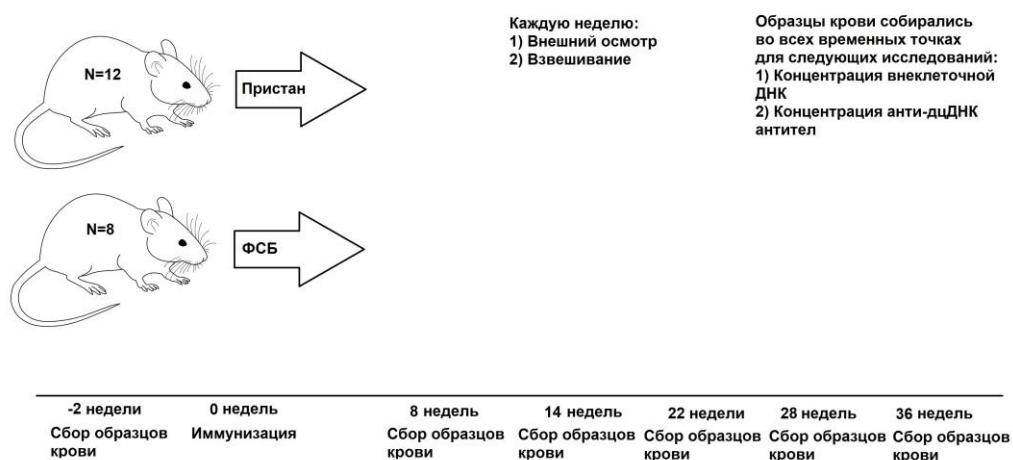


Рисунок 3. Дизайн эксперимента по изучению ассоциаций между концентрациями внеклеточной ДНК, антител к ДНК и клиническими признаками заболевания, выполненного на пристан-индуцированной модели СКВ мышей.

2.3.2.2. Определение концентрации общей внеклеточной ДНК

Выделение внеклеточной ДНК из плазмы крови проводили с помощью набора D-Blood-250 (Биолабмикс, Россия) согласно инструкции производителя. Анализ концентрации внеклеточной ДНК проводили с помощью набора Qubit dsDNA High Sensitivity Assay Kit на флуориметре Qubit 4 (ThermoFisher Scientific, Германия).

2.3.2.3. Определение концентрации антител к двуцепочечной ДНК

Концентрацию антител к двуцепочечной ДНК (анти-dsDNA) определяли с помощью иммуноферментного анализа, используя набор для количественного определения антител мыши к дцДНК (кат. № EM1471, FineTest, Ухань, Китай). Оптическую плотность измеряли на фотометре для микропланшетов Multiskan™ FC (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) при длине волны 450 нм в соответствии с рекомендациями производителя.

2.4. Статистический анализ

Статистический анализ и визуализацию полученных данных проводили в OriginPro 2021, а также в среде для обработки кода Google Colab с использованием библиотек NumPy 2.3.3, SciPy 1.16.2 и Matplotlib 3.10.6 на языке программирования Python 3.13.0.

Определение типа распределения данных в выборках проводили с помощью критерия Шапиро–Уилка. Сравнение значений двух независимых выборок с ненормальным распределением данных проводилось с помощью U-критерия Манна–Уитни. Сравнение трёх и более независимых выборок с ненормальным распределением данных проводили с помощью критерия Краскелла–Уоллиса с апостериорным тестом Данна для попарного сравнения каждой из выборок. Сравнение двух зависимых выборок в разных временных точках проводили с помощью критерия Уилкоксона. При сравнении нескольких выборок с ненормальным распределением данных с учётом влияния различных ковариат (например, влияние пола и возраста на концентрацию HMGB1) использовали ранговый ковариационный анализ (ANCOVA) с апостериорным тестом Данна для определения различий между отдельными выборками. Разницу в категориальных переменных (частота встречаемости признака) оценивали с помощью критерия Хи-квадрат.

Корреляционный анализ выборок с ненормальным распределением проводили с помощью критерия Спирмена (для групп с числом значений более 35). При наличии небольшого количества значений в выборке (меньше 35) или при наличии в них большого количества повторяющихся значений (например, индекс SELENA-SLEDAI) использовали

критерий Кендалла. При определении корреляционных взаимоотношений между выборками, каждая из которых содержала данные с нормальным распределением, использовали критерий Пирсона. Для оценки связи между исследуемыми переменными (например, индекс SELENA-SLEDAI) и потенциальными предикторами (например, уровень ДНК-гидролизующей активности IgG) использовали метод множественной линейной регрессии. Перед проведением множественного регрессионного анализа все данные нормировали путём логарифмирования по основанию 10.

Для снижения размерности данных использовали частичный дискриминативный анализ методом анименьших квадратов (PLS-DA). Стратификация пациентов на две группы на основе уровня ДНК-гидролизующей активности IgG выполнена с использованием алгоритма пространственной кластеризации на основе плотности с шумом (DBSCAN). Анализ распределения данных и функции плотности вероятности проводили с использованием алгоритма оценки плотности ядра (KDE) и диаграмм распределения.

Статистически значимыми считали результаты с p -значением < 0.05 . При необходимости использовали поправку на множественные сравнения Хохберга–Бонферрони.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Клинико-анамнестические данные пациентов и здоровых доноров

Данная работы выполнена с использованием двух отдельных выборок пациентов с СКВ и здоровых доноров. Использование двух групп связано с тем, что для выделения антител требуется большое количество плазмы крови. Кроме того, из-за большого количества анализируемых аларминов методом ИФА и ПЦР трудно спрогнозировать необходимый объём плазмы для этих исследований с учётом возможных повторов из-за неудачных экспериментов.

Первую выборку, которая состояла из 24 пациентов с СКВ и 73 здоровых доноров, использовали для исследования концентраций аларминов и их возможной связи с клиническими признаками заболевания. Примечательно, что в данной выборке в качестве групп сравнения отобраны не только здоровые доноры, но и пациенты с ревматоидным артритом (РА), анкилозирующим спондилитом/болезнью Бехтерева (АС) и псориатическим артритом (ПсА). Все данные по этой выборке представлены в Таблице 6. В группу пациентов с СКВ включались только женщины, так как это заболевание встречается чаще у женщин. Согласно литературным данным, соотношение женщин и мужчин среди пацентов обычно составляет 9:1 и варьирует от 4 до 11 женщин к 1 мужчине в зависимости от региона [241]. Для других анализируемых заболеваний соотношение мужчин и женщин соответствовало средним значениям в популяции. В частности, для РА характерно соотношение 1 мужчина к 3 женщинам, для анкилозирующего спондилита – наоборот, 3 мужчины к 1 женщине [242]. Для псориатического артрита характерно примерно равное соотношение мужчин к женщинам (1:1) [242]. Подобные соотношения наблюдались в анализируемых выборках, представленных в Таблице 6. Важно отметить, что выборки пациентов с ревматическими заболеваниями не различались по таким важным воспалительным маркёрам, как СОЭ и СРБ, а также возрасту, что делает сравнение этих групп более релевантным. При этом у пациентов с СКВ концентрация антител к двуцепочечной ДНК как минимум на порядок оказалась выше, чем у пациентов с другими ревматическими заболеваниями, что соответствует литературным данным [243]. Все представленные выше данные указывают на то, что клинические характеристики пациентов, описанные в Таблице 6, соответствовали классическим характеристикам анализируемых заболеваний. Кроме того, чтобы учесть различия в половозрастных характеристиках и длительности заболеваний, эти факторы учитывались в качестве ковариат при анализе ковариации (ANCOVA) и оценке значимости различий маркеров.

Таблица 6. Клинические данные пациентов с ревматоидным артритом (РА), анкилозирующим спондилитом (АС), псориатическим артритом (ПсА), системной красной волчанкой (СКВ) и здоровых доноров (ЗД), включенных в исследование для анализа аларминов и их ассоциаций с признаками заболеваний.

Признак	РА (n=60) (1)	АС (n=60) (2)	ПсА (n=30) (3)	СКВ (n=24) (4)	ЗД (n=73) (5)	p- значение
Пол (м/ж, %)	22/78	69/31	30/70	0/100	30/70	<0.01
Возраст, лет	52 (36, 61)	46 (38, 52)	44 (34, 56)	44 (31, 54)	45 (29, 51)	Н.З.
Длительность заболевания, лет	9 (5, 17.5)	12 (7.8, 22.3)	12.5 (3, 21.3)	6 (3, 14)	–	2 vs. 4: <0.01
ИМТ	26 (23, 29)	25.8 (21.5, 28.1)	25.9 (21.2, 30)	25.2 (21, 28)	23.5 (20.2, 26.3)	Н.З.
СОЭ, мм/ч	2.6 (0.8, 11.5)	2.8 (1.1, 6.2)	4.3 (2.4, 9.8)	2.2 (0.8, 8.9)	–	Н.З.
СРБ, мг/л	14.5 (6.8, 28)	10 (4, 18)	16 (10, 26)	15 (8.5, 38)	–	Н.З.
Анти-дцДНК АТ, МЕ/мл	2.6 (0.7, 5.2)	1.8 (0.9, 3.9)	–	21.4 (8.8, 117)	0.45 (0, 1.8)	1 vs. 4 и 5: <0.02 2 vs. 4: <0.001 4 vs. 5: <0.0001
Клинический индекс	DAS28: 3.4 (2.6, 4.6)	ASDAS- CRP: 1.7 (1.3, 2.5) ASDAS- ESR: 1.8 (1.31, 2.6) BASDAI: 1.9 (1, 3.2)	DAS28: 3.5 (1, 9.4) DAPSA: 14 (6, 22)	SELENA- SLEDAI: 4 (2, 8)	–	–

Результаты представлены в виде медианы (Q1, Q3) для количественных показателей или в виде относительных частот (%) для категориальных данных. Для оценки значимости различий использовали критерий Краскела–Уоллиса с апостериорным тестом Данна, для количественных показателей или критерий хи-квадрат для категориальных данных. ЗД – здоровые доноры; ИМТ – индекс массы тела; СОЭ – скорость оседания эритроцитов; СРБ – С-реактивный белок; анти-дцДНК АТ – антитела к двуцепочечной ДНК; DAS28 – шкала активности заболевания 28 (от англ., disease activity score 28); ASDAS-CRP – шкала активности анкилозирующего спондилита с использованием СРБ (от англ., the ankylosing spondylitis disease activity score using C-reactive protein); ASDAS-ESR – шкала активности анкилозирующего спондилита с использованием СОЭ (от англ., the ankylosing spondylitis disease activity score using erythrocyte sedimentation rate); BASDAI – Батский индекс активности анкилозирующего спондилита (от англ., Bath ankylosing spondylitis activity index);

DAPSA – индекс активности псориатического артрита (от англ., disease activity in psoriaticarthritis); Н.З. – не значимо. Статистически значимыми считались результаты с р-значением < 0.05 .

У большинства пациентов с РА наблюдалась умеренная активность заболевания, исходя из значений индекса DAS28 (Таблица 6). 80% и 82% пациентов с РА имели положительный тест на ревматоидный фактор и антитела к циклическому цитруллинированному пептиду соответственно. Среди пациентов с АС 76% являлись носителями 27-го аллеля локуса В гена человеческого лейкоцитарного антигена (HLA-B27). У пациентов с АС в основном наблюдалась низкая активность заболевания согласно индексам ASDAS-CRP/ASDAS-ESR и умеренная активность согласно индексу BASDAI. У большинства пациентов с ПсА наблюдалась умеренная активность заболевания согласно индексам DAS28 и DAPSA. Важно отметить, что все пациенты получали терапию. В частности, 56% пациентов с РА, 79% с АС и 47% с ПсА получали генно-инженерные биологические препараты (ГИБП), а остальные пациенты получали синтетические базисные противовоспалительные препараты (сБПВП) или глюкокортикостероиды. Среди ГИБП наиболее распространенным препаратом при РА был ритуксимаб (63% пациентов), но пациенты также принимали голимумаб, цертолизумаб пегол, олокизумаб и сарилумаб. Пациенты с АС получали цертолизумаб пегол (28,5%), нетакимаб (19%), секукинумаб (17%), адалимумаб (14%), голимумаб (12%) и иксекизумаб (9,5%). При ПсА пациенты получали цертолизумаб пегол (29%), секукинумаб (29%), нетакимаб (21%), иксекизумаб (14%) и гуселькумаб (7%). Среди сБПВП метотрексат получали 43% пациентов с ревматоидным артритом (РА), 32% с АС, 40% с ПсА и 8% с СКВ. Пациенты с СКВ получали только сБПВП, при этом наиболее распространенным препаратом оказался гидроксихлорохин (71%). 88% пациентов с СКВ, 23% пациентов с РА и 6% пациентов с АС принимали глюкокортикостероиды (в основном преднизолон). Пациенты с ПсА не получали глюкокортикостероиды.

Вторая выборка состояла из 56 пациентов с СКВ и 35 здоровых доноров. Данную выборку использовали для выделения антител из плазмы крови и анализа их каталитической активности. Клинико-anamнестические данные этой выборки представлены в Таблице 7.

Таблица 7. Клинические данные пациентов с системной красной волчанкой (СКВ) и здоровых доноров (ЗД) из групп исследования каталитических активностей IgG плазмы крови.

Параметр	СКВ (n=56)	ЗД (n=35)	p-значение
Пол (ж/м, %)	100/0	100/0	—
Возраст, лет	50.5 (40, 59)	45 (38, 59)	0.35
Длительность заболевания, годы	8.5 (4, 17)	—	—
SELENA-SLEDAI, баллы	6 (4, 10)	—	—
Анти-оцДНК АТ, нг/мл	39.6 (12, 154)	3 (1, 17)	0.00003
Анти-дцДНК АТ, нг/мл	61.5 (28, 189)	12 (8, 21)	0.00006
Течение (острое/подострое/хроническое, %)	2/27/71	—	—
Активность заболевания (высокая/умеренная/ низкая/ минимальная, %)	16/49/2/33	—	—
Фаза (активная/ неактивная, %)	96/4	—	—

Результаты представлены в виде медианы (Q1, Q3) для количественных показателей или в виде относительных частот (%) для категориальных данных. Для оценки значимости различий использовали U-критерий Манна–Уитни для количественных показателей или критерий хи-квадрат для категориальных данных. SELENA-SLEDAI – национальная оценка безопасности эстрогенов при волчанке – индекс активности системной красной волчанки; анти-оцДНК ат – антитела к одноцепочечной ДНК; анти-дцДНК АТ – антитела к двуцепочечной ДНК. Статистически значимыми считались результаты с p-значением < 0.05.

Аналогично первой выборке, в данную выборку включались только женщины, из-за большей распространенности СКВ у женщин [241]. В качестве здоровых доноров отбирали только женщин, что полностью нивелирует влияние пола в исследовании каталитических активностей антител. Возраст участников в группах СКВ и здоровых доноров достоверно не различался (Таблица 7). Закономерно, что у пациентов с СКВ выявлена более высокая

концентрация IgG-антител к одноцепочечной (анти-оцДНК) и двуцепочечной (анти-дцДНК) ДНК в сыворотке крови по сравнению с контрольной группой. Медианное значение длительности заболевания составило 8,5 лет. Медианное значение индекса активности SELENA-SLEDAI составило 6 баллов. Большинство пациентов (96%) находились в активной фазе заболевания. Примерно у половины пациентов с СКВ (49%) наблюдалась умеренная активность болезни, хотя в выборке присутствовали пациенты с высокой (16%), низкой (2%) и минимальной активностью (33%). У большинства пациентов (71%) отмечалось хроническое течение СКВ.

3.2. Концентрация аларминов и маркёров нетоза

3.2.1. Общая, ядерная и митохондриальная внеклеточная ДНК

Внеклеточная ДНК (вкДНК) представляет собой один из наиболее изученных аларминов, в том числе при СКВ [244]. Циркулирующая вкДНК считается неспецифическим маркером клеточной смерти, в том числе путем нетоза [245]. Общая циркулирующая вкДНК считается интегральным показателем всех циркулирующих нуклеиновых кислот в экзосомах, везикулах и в комплексах с ДНК-связывающими белками, поскольку в процессе анализа происходит разрушение везикул и ДНК-белковых комплексов. Кроме того, используемый метод анализа (флуорометрическое обнаружение ДНК с помощью интеркалирующего красителя) позволяет регистрировать в основном дцДНК [246]. В рамках данной работы особое внимание уделено сравнению уровня общей вкДНК при СКВ и других ревматических заболеваниях, таких как РА, АС и ПсА. Литературные данные об общей вкДНК посвящены в основном СКВ и РА [247], в то время как при АС и ПсА таких данных мало. Кроме того, сравнение нескольких ревматических заболеваний в одном эксперименте представляет большой интерес, поскольку дает возможность выявить потенциальные маркеры для дифференциальной диагностики и обнаружить характерные изменения при каждом заболевании.

На Рисунке 4 приведены данные о концентрации общей внеклеточной ДНК в плазме крови пациентов с различными ревматическими заболеваниями и здоровыми донорами. Ковариационный анализ (ANCOVA) с учетом пола, возраста, длительности заболевания в качестве ковариат показал, что эти переменные не являлись значимыми ковариатами в модели ANCOVA. Следовательно, эти переменные не оказывали существенного влияния на концентрации общей вкДНК. Проведенный анализ показал, что концентрация общей вкДНК увеличивалась только при СКВ и АС по сравнению с контрольной группой (Рисунок

3). Полученные данные о повышении общей вкДНК при СКВ согласуются с результатами ряда предыдущих исследований [105, 106, 248, 249, 107, 97, 108, 250, 147, 251, 96]. Литературные данные также подтверждают высокий уровень общей вкДНК при АС [252, 253, 254]. Стоит отметить, что медианное значение общей вкДНК оказалось наиболее высоким при СКВ, хотя значимых отличий по сравнению с другими ревматическими заболеваниями не выявлено (Рисунок 3).

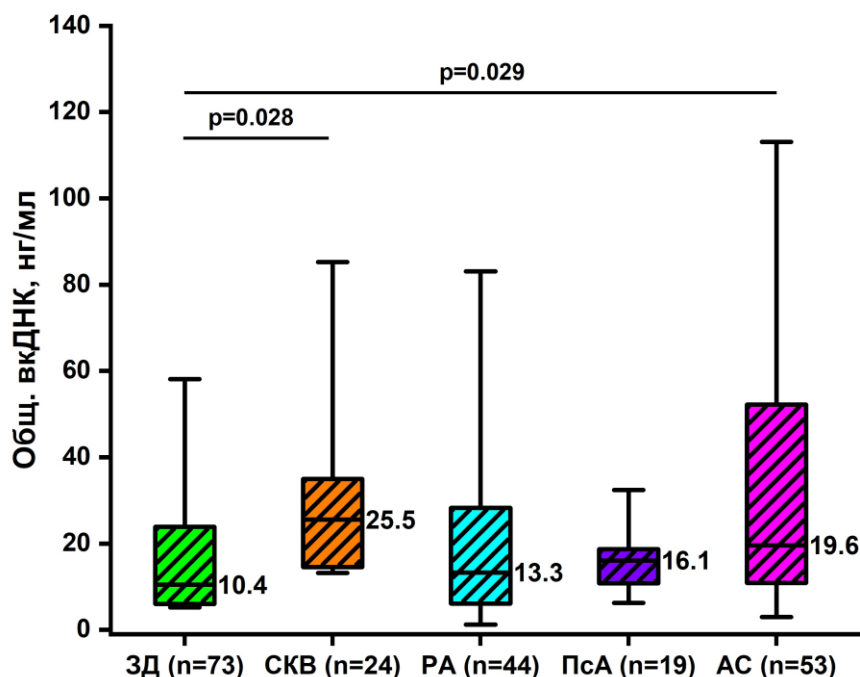


Рисунок 4. Концентрации общей внеклеточной ДНК (вкДНК) в плазме здоровых доноров (ЗД), пациентов с системной красной волчанкой (СКВ), ревматоидным артритом (РА), псориазическим артритом (ПсА) и анкилозирующим спондилитом (АС). Горизонтальная полоса внутри «ящика» и значение справа от него – медиана; низ и верх «ящика» – первый и третий квартиль; границы усов – полтора интерквартильных размаха. Статистические различия определяли с помощью анализа ковариации (ANCOVA) с апостериорным тестом Тьюки с поправкой на множественные сравнения, где пол, возраст и длительность заболевания учитывали в качестве ковариат.

При ПсА и РА не выявлено значимых отличий в уровне общей вкДНК по сравнению со здоровыми донорами (Рисунок 3). Для ПсА не удалось найти опубликованные исследования об общей вкДНК, за исключением одной работы, в которой проведен анализ числа копий фрагментов ДНК, несущих ген $TNF-\alpha$, в сыворотке пациентов с ПсА [255]. Опубликованные работы в основном посвящены изучению псориаза, при котором также показано повышение общей вкДНК [256], но который значительно отличается по клиническим проявлениям от ПсА. В исследованиях, посвященных РА, отмечается в основном повышение уровня общей вкДНК [106, 147, 148, 257, 258], за исключением

одного исследования, в котором показано снижение этого показателя [259]. Результаты данной работы об отсутствии значимых изменений уровня общей вкДНК при РА может быть связано с эффектами лечения, что будет рассмотрено далее.

Пул циркулирующих нуклеиновых кислот включает ДНК ядерного и митохондриального происхождения, которые различаются по воспалительному потенциалу [260]. Поэтому далее в работе исследованы концентрации ядерной и митохондриальной вкДНК методом цифровой ПЦР (Рисунок 5). ANCOVA анализ показал, что возраст, пол и длительность заболевания значимо не влияли на уровни ядерной и митохондриальной вкДНК. В результате анализа установлено, что концентрация ядерной вкДНК достоверно повышалась при всех четырех анализируемых ревматических заболеваниях по сравнению со здоровыми людьми, причем наиболее высокие медианные значения концентрации ядерной вкДНК наблюдали при СКВ (Рисунок 5А), однако значимых различий с другими заболеваниями не выявлено. Большинство исследований подтверждает полученные данные о повышении концентрации ядерной вкДНК у пациентов с СКВ по сравнению со здоровыми донорами [108, 261, 262], хотя также опубликована работа, где такого различия не обнаружено [249].

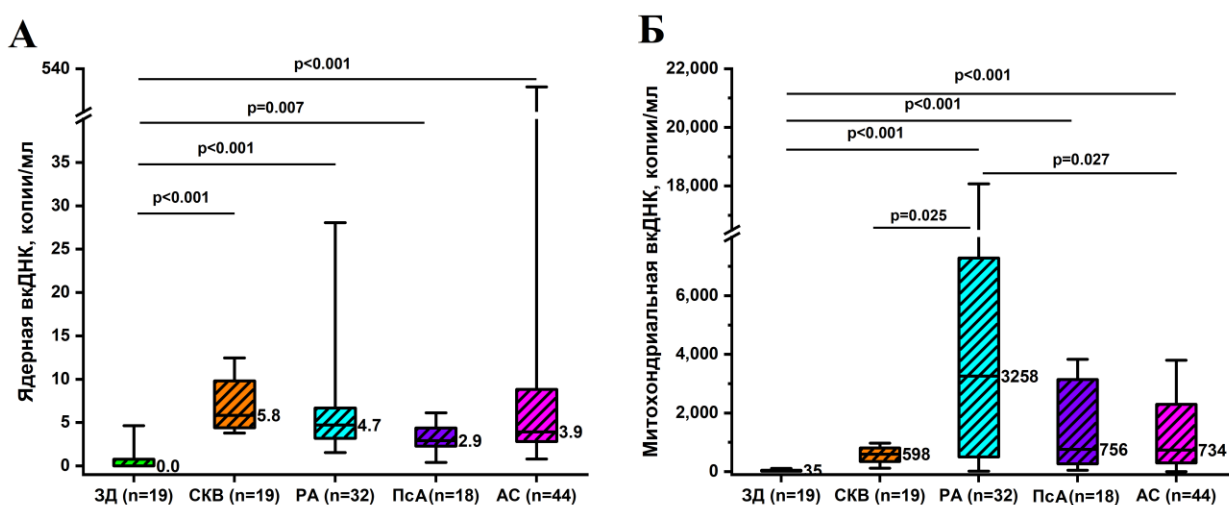


Рисунок 5. Концентрация ядерной (А) и митохондриальной (Б) внеклеточной ДНК (вкДНК) в плазме здоровых доноров (ЗД), пациентов с системной красной волчанкой (СКВ), ревматоидным артритом (РА), псориатическим артритом (ПсА) и анкилозирующим спондилитом (АС). Горизонтальная полоса внутри «ящика» и значение справа от него – медиана; низ и верх «ящика» – первый и третий квартиль; границы усов – полтора интерквартильных размаха. Статистические различия определяли с помощью анализа ковариации (ANCOVA) с апостериорным тестом Тьюки с поправкой на множественные сравнения, где пол, возраст и длительность заболевания учитывали в качестве ковариат.

При анализе митохондриальной вкДНК наблюдали иную картину (Рисунок 4Б). Концентрация митохондриальной вкДНК оказалась повышена при четырех ревматических заболеваниях по сравнению с контрольной группой. Однако наиболее высокие уровни митохондриальной вкДНК наблюдали при РА, а самые низкие — при СКВ. Полученные данные о повышении митохондриальной вкДНК при СКВ по сравнению со здоровыми донорами согласуется с некоторыми из немногочисленных литературных данных [108, 249], хотя опубликованы данные и о снижении этого показателя при СКВ [261]. В случае АС и ПсА в литературе не удалось найти данные о ядерной и митохондриальной вкДНК, поэтому результаты данного исследования восполняют этот пробел в знаниях. Литературные данные о вкДНК при РА противоречивы. В частности, в работе Рыковой с соавт., показано повышение ядерной, но не митохондриальной вкДНК [263], а в исследовании Леманна с соавт. выявлено повышение митохондриальной при неизменном уровне ядерной вкДНК [264]. Подобные несоответствия могут быть связаны с влиянием терапии, что рассмотрено далее. Тем не менее, можно предположить, что выявленное повышение уровня митохондриальной вкДНК при РА может быть связано с повреждением митохондрий [265].

В ходе анализа влияния терапии на концентрацию вкДНК установлено, что у пациентов с РА, получающих ГИБП, к которым относятся различные моноклональные антитела, например, инфликсимаб, концентрация митохондриальной внеклеточной ДНК в 8 раз ниже, чем у пациентов, которые принимали сБПВП, например, метотрексат (Таблица 8). Для других анализируемых заболеваний каких-либо ассоциаций между концентрацией внеклеточной ДНК и проводимой терапией не выявлено.

Таблица 8. Концентрация митохондриальной внеклеточной ДНК (мт-вкДНК) в плазме пациентов с РА, принимающих синтетические базисные противовоспалительные препараты (сБПВП) и генно-инженерные биологические препараты (ГИБП).

Маркёр	сБПВП (n=11)	ГИБП (n=21)	P-значение
Мт-вкДНК	5711 (1996, 11720)	703 (405, 5183)	0.021

Результаты представлены в виде медианы (1-й квартиль, 3-й квартиль). Статистическую значимость различий оценивали с помощью U-критерия Манна-Уитни.

Таким образом, полученные данные указывают на то, что увеличение количества общей вкДНК при СКВ связано, главным образом, с увеличением количества ядерной вкДНК, тогда как при РА в большей степени увеличивается содержание митохондриальной вкДНК. При ПсА и АС вклад ядерной и митохондриальной вкДНК довольно близок. Увеличение уровня вкДНК может быть неспецифическим маркером нетоза, однако стоит

учитывать, что вкДНК может высвобождаться при других типах клеточной смерти, а также активно секретироваться в составе экзосом и везикул [266].

3.2.2. HMGB1

Белок группы высокой мобильности В1 (HMGB1) считается одним из основных аларминов ядерного происхождения, инициирующий воспалительный ответ через рецепторы TLR4 и RAGE [267]. Кроме того, он способен действовать в комплексе с ядерной ДНК, облегчая проникновение её в клетку, что повышает иммуногенный эффект ДНК [268]. Из полученных результатов, представленных на Рисунке 6, видно, что наиболее высокая концентрация HMGB1 выявлена при СКВ, что согласуется с литературными данными [269, 270]. Пол, возраст и длительность заболевания не оказывали значимого влияния в модели ANCOVA. Примечательно, что у пациентов с СКВ также выявлен наиболее высокий уровень общей и геномной вкДНК (Рисунки 4 и 5), что также указывает на ядерное происхождение вкДНК, поскольку HMGB1 – это ДНК-связывающий белок и может выделяться из клеток в комплексе с ДНК [271], в том числе в процессе нетоза.

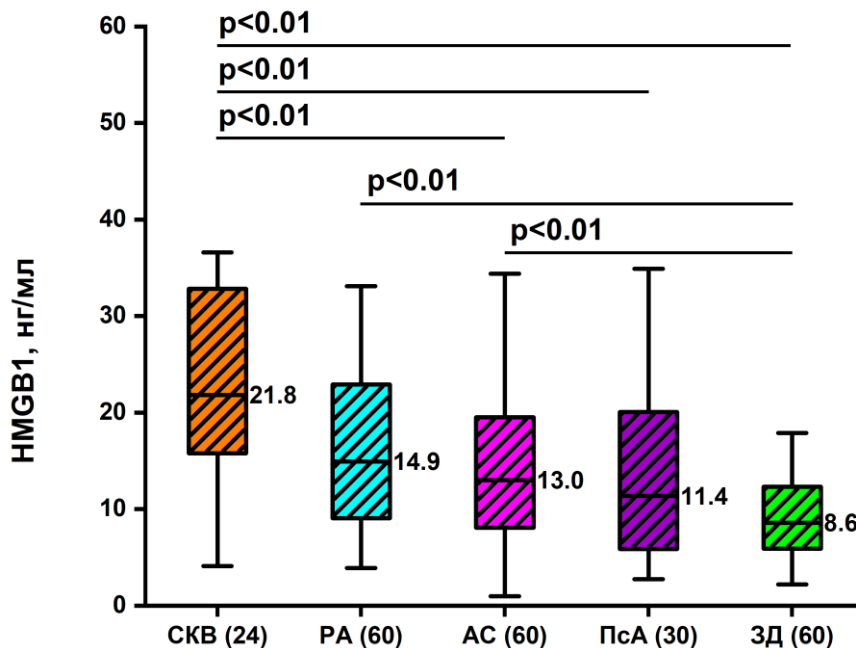


Рисунок 6. Концентрация белка группы высокой мобильности В1 (HMGB1) в плазме здоровых доноров (ЗД), пациентов с системной красной волчанкой (СКВ), ревматоидным артритом (РА), псориатическим артритом (ПсА) и анкилозирующим спондилитом (АС). Горизонтальная полоса внутри «ящика» и значение справа от него – медиана; низ и верх «ящика» – первый и третий квартиль; границы усов – полтора интерквартильных размаха. Статистические различия определяли с помощью анализа ковариации (ANCOVA) с апостериорным тестом Тьюки с поправкой на множественные сравнения, где пол, возраст и длительность заболевания учитывали в качестве ковариат.

3.2.3. Цитруллинированный гистон НЗ

Цитруллинированный гистон НЗ считается алармином и специфичным маркером нетоза [272, 273]. Проведенный анализ показал, что у пациентов с СКВ концентрация цитруллинированного НЗ не только статистически значимо превышает таковую у здоровых доноров, но и у пациентов с другими ревматическими заболеваниями (Рисунок 7). Пол, возраст и длительность заболевания не оказывали значимого влияния на уровень цитруллинированного НЗ в модели ANCOVA. Полученные результаты косвенно указывают на то, что повышение общей и ядерной вкДНК, HMGB1 при СКВ может быть связано с повышенной нетотической активностью. Опубликованные литературные данные также подтверждают высокий уровень маркеров нетоза при СКВ, в том числе цитруллинированного НЗ [134, 274]. Кроме того, цитруллинированный НЗ проявляет иммуногенную активность, выступая в роли алармина. Он способен связываться с мембранными TLR2 и TLR4, на макрофагах, дендритных клетках, эндотелиальных и эпителиальных клетках, что приводит к высвобождению большого количества таких провоспалительных цитокинов, как TNF- α , IL-6, и IL-1 β , что в свою очередь привлекает новые нейтрофилы в очаг поражения, замыкая порочный круг [272].

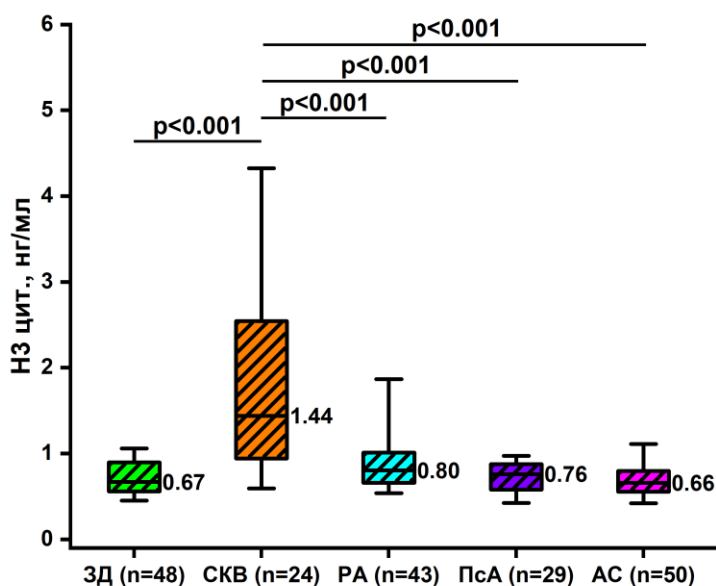


Рисунок 7. Концентрация цитруллинированного гистона НЗ (НЗ цит.) в плазме здоровых доноров (ЗД), пациентов с системной красной волчанкой (СКВ), ревматоидным артритом (РА), псориазическим артритом (ПсА) и анкилозирующим спондилитом (АС). Горизонтальная полоса внутри «ящика» и значение справа от него – медиана; низ и верх «ящика» – первый и третий квартиль; границы усов – полтора интерквартильных размаха. Статистические различия определяли с помощью анализа ковариации (ANCOVA) с апостериорным тестом Тьюки с поправкой на множественные сравнения, где пол, возраст и длительность заболевания учитывали в качестве ковариат.

3.2.4. Миелопероксидаза

Миелопероксидаза (МПО) наряду с цитруллинированным НЗ является высокоспецифичным маркёром нетоза, но не считается алармином [275]. Согласно результатам ANCOVA, концентрации МПО повышались при СКВ и РА по сравнению со здоровыми донорами (Рисунок 8). Примечательно, что у пациентов с СКВ наблюдали самые высокие уровни МПО по сравнению с другими ревматическими заболеваниями. Концентрации МПО оказались выше при РА, чем при АС. Уровень МПО также повышался при ПсА по сравнению с АС. Стоит отметить, что пол, возраст и длительность заболевания не оказали существенного влияния на полученные данные. Таким образом, специфические маркеры нетоза, такие как цитруллинированный НЗ и МПО, в наибольшей степени повышались при СКВ, указывая на вклад нетоза в повышение уровня вкДНК и HMGB1 в плазме крови пациентов. Данные о повышении уровня МПО при СКВ согласуются с литературными [276].

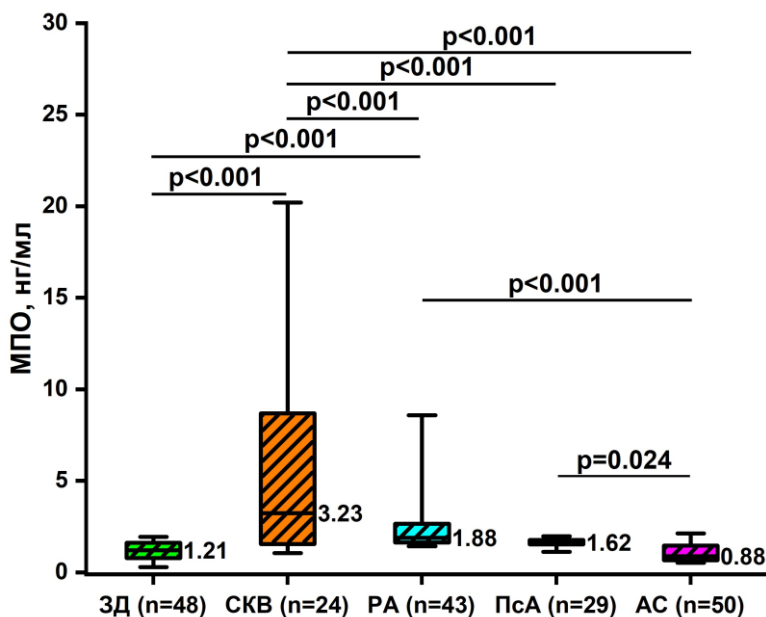


Рисунок 7. Концентрация миелопероксидазы (МПО) в плазме здоровых доноров (ЗД), пациентов с системной красной волчанкой (СКВ), ревматоидным артритом (РА), псориатическим артритом (ПсА) и анкилозирующим спондилитом (АС). Горизонтальная полоса внутри «ящика» и значение справа от него – медиана; низ и верх «ящика» – первый и третий квартиль; границы усов – полтора интерквартильных размаха. Статистические различия определяли с помощью анализа ковариации (ANCOVA) с апостериорным тестом Тьюки с поправкой на множественные сравнения, где пол, возраст и длительность заболевания учитывали в качестве ковариат.

3.2.5. Комбинированные профили маркёров нетоза

Частичный дискриминантный анализ методом наименьших квадратов (PLS-DA) является эффективным инструментом для снижения размерности данных и графического представления сходства или различия в анализируемых образцах. В данной работе PLS-DA применен для представления комбинированных профилей маркеров нетоза, таких как общая, ядерная и митохондриальная вкДНК, HMGB1 и цитруллинированный гистон H3. Результат, представленный на графиках PLS-DA, демонстрирует, что только пациенты с СКВ значительно отличались от здоровых лиц, поскольку эллипсы 95% доверительного интервала не перекрывались (Рисунок 9). В остальных случаях профили пациентов и здоровых добровольцев в значительной степени перекрывались, что указывает на близкие уровни маркеров нетоза. В литературе не удалось найти работ с использованием подобного подхода, поэтому данная работа позволила наглядно продемонстрировать наиболее яркие изменения маркеров нетоза при СКВ в отличие от других ревматических заболеваний. С другой стороны, повышение уровня маркеров нетоза может быть связано не с усилением нетотической активности при СКВ, а с ухудшением клиренса нетотического материала. На это указывает ряд фактов, обозначенных в обзоре литературы: 1) у пациентов с СКВ часто встречаются мутации, нарушающие нормальную работу нуклеаз [35, 36]; 2) у пациентов с СКВ возрастает активность ингибитора ДНКазы I [34]; 3) ДНК может быть экранирована от действия нуклеаз за счёт образования комплексов с антителами [60].

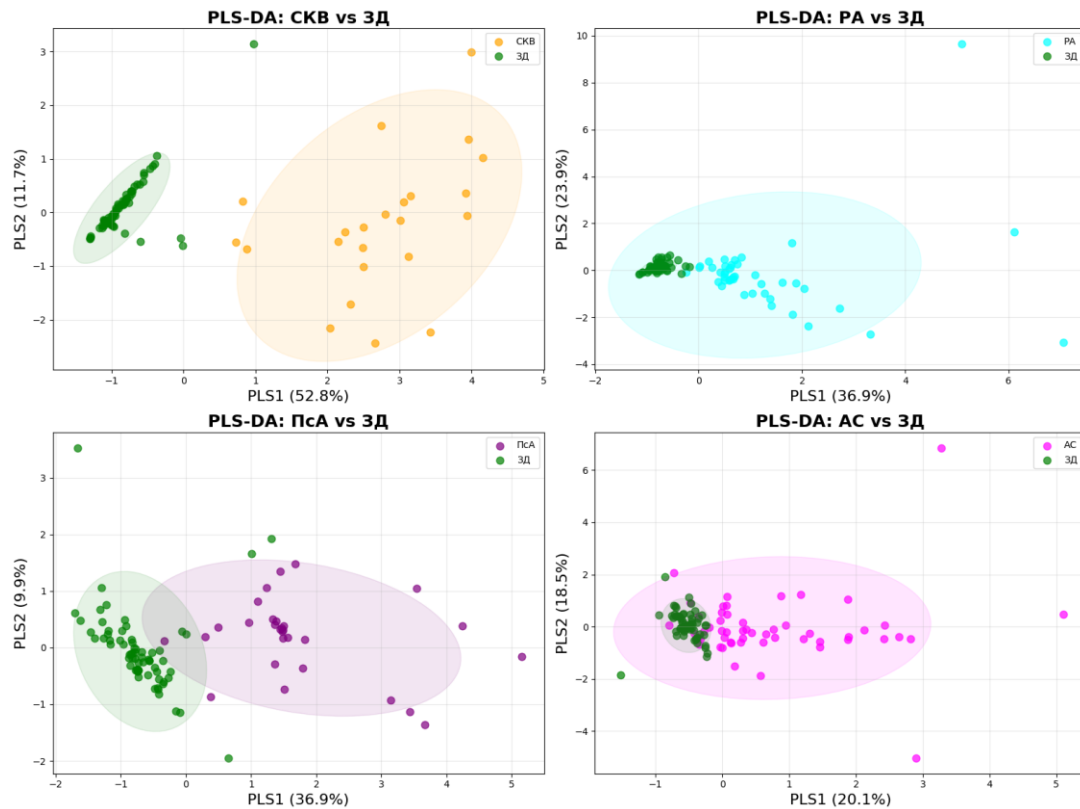


Рисунок 9. График частичного дискриминантного анализа методом наименьших квадратов (PLS-DA), отражающий комбинированные профили биомаркеров, ассоциированных с нетозом. Представлено попарное сравнение профилей для всех анализируемых групп. Каждая точка соответствует отдельному участнику исследования. На рисунках показаны эллипсы 95% доверительного интервала. Отсутствие перекрытия эллипсов указывает на хорошее разделение между образцами. И напротив, перекрывающиеся эллипсы свидетельствуют о сходстве между группами по уровням маркеров нетоза.

3.2.6. Связь с клиническими проявлениями заболевания

Далее проводили оценку связи концентраций маркёров нетоза с клиническими признаками СКВ. Используемые для анализа клиничко-anamnestические данные представлены в Таблице 6. Кроме этих данных использовали также титр антинуклеарных антител и скорость клубочковой фильтрации (СКФ), которые являются важными показателями течения СКВ [277, 278]. Полученные статистически значимые корреляции представлены в Таблице 8. Прямая корреляция между цититруллинированным НЗ и МПО указывают на повышенную нетотическую активность при СКВ. Обратная корреляция между МПО и СКФ говорит о вовлечённости нетоза в повреждение почек, которые являются одним из органов-мишеней при СКВ. Согласно литературным данным, внеклеточный нейтрофильные ловушки обнаруживаются в почках пациентов с СКВ, а нетоз играет большую роль в патогенезе такого серьёзного осложнения СКВ, как волчаночный нефрит [10].

Таблица 8. Корреляции между маркёрами нетоза и клинико-anamнестическими параметрами пациентов с СКВ.

Параметр	Цит. НЗ	МПО
Возраст	Rk=0.33; p=0.03	
ИМТ	Rk=0.34; p=0.028	
МПО	Rk=0.33; p=0.046	
СКФ		Rk=-0.61; p=0.001

Rk – коэффициент корреляции Кендалла; Цит. НЗ – цитруллинированный гистон НЗ; МПО – миелопероксидаза; ИМТ – индекс массы тела; СКФ – скорость клубочковой фильтрации. Статистически значимыми считали результаты с р-значением < 0.05. Статистическую достоверность определяли с помощью критерия Кендалла.

Ещё одним важным органом-мишенью при СКВ является сердце. Ранее в нашей лаборатории показано, что у пациентов с СКВ с и без заболеваний сердечно-сосудистой системы значительно отличается цитокиновый профиль, в частности показано повышение концентрации провоспалительных цитокинов у пациентов с СКВ с сопутствующими сердечно-сосудистыми патологиями [279]. В данной работе показано, что у пациентов с СКВ с заболеваниями сердечно-сосудистой системы значительно повышаются высокоспецифичные маркёры нетоза: цитруллинированный гистон НЗ и МПО. Результаты представлены в Таблице 9. В настоящее время считается, что нетоз вовлечен в патогенез таких сердечно-сосудистых патологий как атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, сердечная недостаточность, легочная гипертензия и др. Очевидно, что патологические механизмы таких заболеваний значительно различаются, но если обобщить их, то роль нетоза может заключаться в повреждении эндотелия, инициации процесса иммунотромбоза и усилении воспаления и ремоделирования, в том числе окисление липопротеинов низкой плотности с образованием ещё более проатерогенных окисленных форм [280, 281, 282].

Таблица 9. Концентрация цитруллинированного гистона НЗ (цит. НЗ) и миелопероксидазы (МПО) в зависимости от наличия сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) у пациентов с СКВ.

Маркёр нетоза	Пациенты без ССЗ (n=14)	Пациенты с ССЗ (n=10)	P-значение
НЗ цит.	1.1 (0.7, 1.8)	2.2 (1.5, 2.9)	0.02
МПО	2.6 (1.4, 4.4)	8.7 (5.8, 10.8)	0.008

Результаты представлены в виде медианы (первый квартиль, третий квартиль). Статистические различия оценивали с помощью U-критерия Манна – Уитни.

Таким образом, корреляционный анализ выявил связь специфических маркеров нетоза с клиническими особенностями СКВ, что еще раз указывает на вовлеченность нетоза в патогенез этого заболевания.

3.2.7. Концентрация цитокинов

Дисрегуляция про- и противовоспалительных цитокинов неразрывно связана с патогенезом СКВ [283]. Поэтому в данной работе изучена концентрация 41-го цитокина, чтобы охарактеризовать изменения в цитокиновой сети и выявить возможные связи с клиническими особенностями заболевания. Среди 41-го проанализированного цитокина, встречались такие группы иммунных регуляторов, как цитокины, хемокины, интерфероны, факторы роста, члены суперсемейства фактора некроза опухоли и факторы роста. Полный список проанализированных молекул представлен в [приложении](#) в Таблице П1. Полученные результаты представлены в виде графика-вулкана (volcano plot) (Рисунок 10), позволяющего наглядно продемонстрировать, какие из молекул статистически значимо отличались у пациентов с СКВ по сравнению со здоровыми донорами (красные точки на графике), а какие – нет (чёрные точки на графике), а также направление и достоверность выявленных изменений.

В результате у пациентов с СКВ обнаружено повышение следующих цитокинов: интерлейкина (IL)-1 β , антагонист рецептора интерлейкина 1 (IL-1RA), IL-6, IL-9, IL-10, IL-15, моноцитарный хемотаксический белок-1 или хемокин CCL2 (MCP-1/CCL2), фактор некроза опухоли α (TNF α), фракталкин или хемокин CX3CL1 (Fractalkine/CX3CL1), воспалительный белок макрофагов 1 α или хемокин CCL3 (MIP-1 α /CCL3), воспалительный белок макрофагов 1 β или хемокин CCL4 (MIP-1 β /CCL4). Кроме того показано, что у здоровых доноров повышаются три цитокина: растворимый лиганд CD40 (sCD40L), тромбоцитарный фактор роста AA (PDGF-AA) и макрофагальный хемокин или хемокин CCL22 (MDC/CCL22). Однако после применения поправки на множественные сравнения Холма-Бонферрони, достоверно повышенными остались только следующие цитокины при

СКВ: IL-15, IL-1RA; IL-6; TNF α ; IL-9 и Fractalkine/CX3CL1, а у здоровых лиц не обнаружено достоверно повышенных цитокинов.

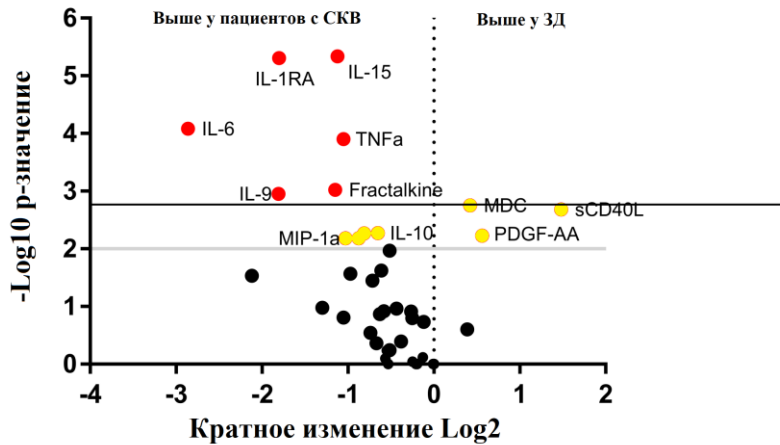


Рисунок 10. Изменения концентраций цитокинов у пациентов с системной красной волчанкой и здоровых доноров. График-вулкан (volcano plot) отражает зависимость логарифмического изменения (кратное изменение Log2) при попарном сравнении медианных значений в двух группах от отрицательного логарифма p-значения ($-\text{Log}_{10}$ p-значения). Серая прямая линия – граница статистической значимости ($p=0.05$). Чёрная прямая линия – граница статистической значимости после применения поправки Холма-Бонферрони. Жёлтыми точками обозначены цитокины, которые статистически значимо повышены в одной из групп ($p<0.05$), но они не прошли поправку на множественные сравнения Холма-Бонферрони. Красными точками обозначены цитокины со статистически значимыми изменениями в концентрации, прошедшие поправку на множественные сравнения Холма-Бонферрони.

Согласно полученным результатам, при СКВ повышается разнообразный набор провоспалительных цитокинов. IL-15 обеспечивает выживание и пролиферацию естественных киллеров и цитотоксических Т-лимфоцитов CD8 $^{+}$ [284, 285]. IL-6 и TNF α считаются базовыми цитокинами воспаления, вовлечёнными в многочисленные процессы при СКВ [286, 287]. Fractalkine/CX3CL1 – это мощный хемоаттрактант, вовлечённый в патогенез СКВ [288]. IL-9 выполняет двойственную как про-, так и противовоспалительные функции. С одной стороны этот цитокин поддерживает развитие активных клеток воспаления – Th17, с другой стороны также поддерживает развитие регуляторных Т-клеток (Treg) [289]. Кроме того показано, что Т-клетки могут производить IL-9 как в про-, так и в противовоспалительном окружении [290]. IL-1RA считается классическим противовоспалительным цитокином, который повышается, по-видимому, компенсаторно [291, 292]. Таким образом, полученные данные подтверждают провоспалительное состояние при СКВ.

Анализ корреляции уровня цитокинов с тяжестью заболевания, выраженной в индексе SELENA-SLEDAI и длительностью заболевания показал положительную связь ряда про- и противовоспалительных цитокинов и хемокинов с индексом SELENA-SLEDAI, что характерно для воспалительного заболевания (Рисунок 11).

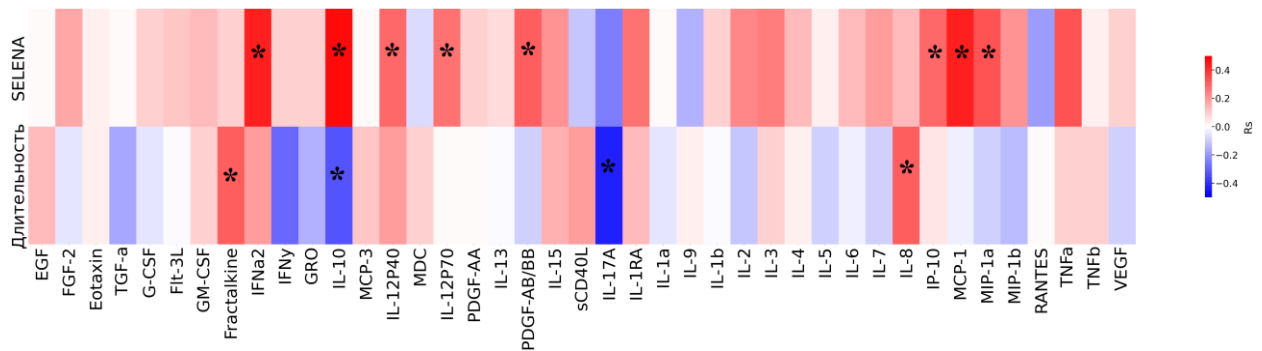


Рисунок 10. Тепловая карта корреляций между тяжестью заболевания, выраженном в индексе SELENA-SLEDAI (SELENA), длительностью заболевания и уровнем цитокинов пациентов с СКВ. Статистически значимые корреляции отмечены «*». Статистическую значимость оценивали с помощью критерия Спирмена.

3.2.8. Заключение по разделу

Полученные результаты о концентрации аларминов при СКВ указывают на преимущественно ядерное происхождение этих аларминов, в отличие от других проанализированных ревматических заболеваний. В частности, повышение уровня общей вкДНК при СКВ происходило за счет вклада ДНК геномного происхождения, в то время как вклад митохондриальной вкДНК оказался минимальным. Кроме того, данные о повышенном уровне специфических маркеров нетоза (цитруллинированного HЗ и МПО) подтверждают вовлеченность нетоза в патогенез СКВ, что обуславливает повышение циркулирующей вкДНК ядерного происхождения. При других заболеваниях изменения в маркерах нетоза оказались менее выражены, указывая на меньшую роль нетоза при этих патологиях. Согласно полученным результатам, маркёры нетоза коррелировали с маркером повреждения почек и наличием сопутствующих сердечно-сосудистых заболеваний при СКВ. Эти данные подчеркивают сложность патогенетических механизмов, связанных с повреждением различных органов, в которых могут быть задействованы молекулы, выделяющиеся при нетозе, у пациентов с СКВ. Анализ широкого спектра цитокинов при СКВ подтвердил провоспалительное состояние у пациентов, что соответствует литературным данным и общим представлениям о патогенезе заболевания. Однако

информация о концентрации цитокинов окажется крайне важной при изучении связи с уровнем каталитической активности антител, рассматриваемой далее.

Кроме того, показано, что у пациентов с РА несоразмерно другим ревматическим заболеваниям повышается концентрация митохондриальной вкДНК. При этом впервые продемонстрировано, что уровень митохондриальной вкДНК тесно связан с видом терапии, которую получают пациенты. Полученные данные указывают на признаки митохондриальной дисфункции при РА, особенно на фоне терапии ГИБП, что открывает перспективы для дальнейшего изучения, а также подчеркивает перспективность поиска возможных клинико-диагностических маркёров митохондриальной природы.

3.3. Антитела к аларминам

3.3.1. Анти-ДНК антитела

В литературном обзоре неоднократно упомянуто, что антитела к ДНК являются высокоспецифичным и диагностически значимым маркёром СКВ [231, 293, 294]. Согласно ранее представленным данным (Таблицы 6 и 7), концентрация анти-ДНК антител у пациентов с СКВ значительно выше, чем у здоровых доноров, что полностью соответствует литературным данным [231, 293, 294].

В рамках настоящей работы также подтверждено, что концентрация анти-оцДНК и анти-дцДНК антител напрямую связаны с тяжестью заболевания. Так, на объединенной группе пациентов с СКВ, взятых из обеих выборок, представленных в Таблицах 6 и 7, показано, что анти-оцДНК антитела статистически достоверно положительно коррелируют с баллами по индексу SELENA-SLEDAI (Коэффициент корреляции Кендалла (R_k)=0.24, $p=0.032$), в то время как анти-дцДНК антитела также прямо коррелировали с индексом SELENA-SLEDAI ($R_k=0.24$, $p=0.037$). Эти результаты полностью согласуются с литературными и говорят о качестве анализируемой выборки пациентов с СКВ [295].

Интересно, что концентрации анти-оцДНК и анти-дцДНК антител не имели статистически значимых корреляций с общей, ядерной и митохондриальной вкДНК. Хотя в некоторых публикациях отмечается положительная корреляция между концентрацией общей вкДНК и тяжестью заболевания, выраженной в баллах по индексу SELENA-SLEDAI [96, 106]. Хотя есть также и публикации, где такая связь не обнаружена [97]. Полученные данные могут быть связаны со следующими факторами: 1) изменчивость концентрации внеклеточной ДНК в крови – как отмечено в обзоре литературы, концентрация вкДНК является достаточно волатильной, и может изменяться в момент времени в ответ на

разнообразные стимулы [98, 99]; 2) эффект времени при образовании антител к конкретному антигену – повышение уровня антител является ответом на появление или увеличение концентрации антигена в прошлом, а не в настоящий момент времени. Подробнее временной эффект в образовании антител к ДНК в ответ на внеклеточную ДНК будет рассмотрен в разделе 3.5, посвящённом экспериментам с лабораторными мышами.

Кроме того, в работе проведён корреляционный анализ между концентрацией анти-ДНК антител и цитокинами в плазме пациентов с СКВ из второй группы (Таблица 7). В результате установлено, что антитела к ДНК имеют достаточно мало статистически значимых корреляций с цитокинами, учитывая широкий спектр проанализированных молекул (41 цитокин). Однако среди обнаруженных корреляций следует выделить наиболее важные (Рисунок 12 и Таблица 10).

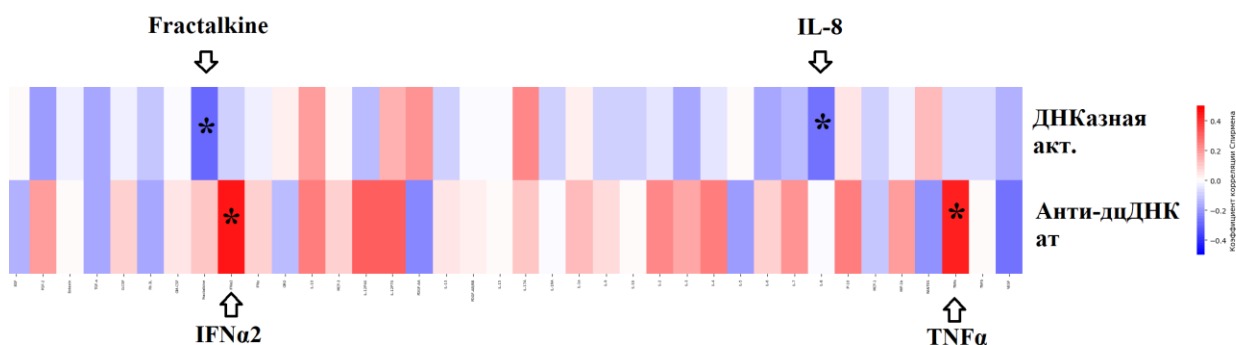


Рисунок 12. Тепловая карта корреляций между концентрацией антител к двуцепочечной ДНК (верхняя строчка), антител к одцепочечной ДНК (нижняя строчка) и уровнем цитокинов у пациентов с СКВ. Статистически значимые корреляции отмечены «*». Статистическую значимость оценивали с помощью критерия Спирмена

Таблица 10. Патогенетически важные корреляции между антителами к одноцепочечной (оц) и двуцепочечной (дц) ДНК и цитокинами.

	Анти-оцДНК ат	Анти-дцДНК ат
MDC	$R_s = -0.43$; $p = 0.02$	$R_s = -0.43$; $p = 0.02$
sCD40L		$R_s = -0.41$; $p = 0.03$
TNFα	$R_s = 0.42$; $p = 0.021$	$R_s = 0.44$; $p = 0.015$
IFNα2		$R_s = 0.45$; $p = 0.03$

В частности, выявлены отрицательные корреляции уровней макрофагального белка MDC и как анти-оцДНК, так и анти-дцДНК антител (Таблица 10). MDC считается важным хемокином, отвечающим за миграцию клеток Treg в очаг воспаления [296], что

способствует контролю аутоиммунного В-клеточного ответа [297, 298]. Поэтому негативным эффектом высоких концентраций этого хемокина можно объяснить выявленную отрицательную корреляцию с уровнем анти-ДНК антител. Отрицательную корреляцию анти-дцДНК антител с sCD40L можно объяснить тем, что этот лиганд активно снижается при терапии гидроксихлорохином [299]. А концентрация антител к двуцепочечной ДНК зачастую ассоциируется с тяжестью заболевания, и, следовательно, дозировками препарата.

TNF α и IFN α 2 принято считать одними из центральных провоспалительных цитокинов, участвующих в патогенезе СКВ. TNF α тесно связан с активностью заболевания и положительно коррелирует с течением СКВ, согласно литературным данным [287]. IFN α 2 относится к IFN I типа, а как отмечено в литературном обзоре, данный цитокин активно вовлечен в патогенез СКВ [32]. Полученный результат важен по двум причинам: во-первых, ещё раз подтверждена связь между антителами к ДНК и крайне важными для патогенеза СКВ цитокинами, и, во-вторых, как будет показано в разделе 3.4.2, посвящённом ДНК-гидролизующей активности IgG у пациентов с СКВ, эта прямая корреляция справедлива только для высокоаффинных классических анти-ДНК антител, но не для каталитических анти-ДНК IgG, что позволяет обсуждать их роль в патогенезе СКВ.

3.3.2. Антитела к гистонам

Антитела к гистонам также связаны с патогенезом СКВ, однако в клинической практике их определяют достаточно редко. Они считаются важными только в контексте лекарственной волчанки, так как при таком состоянии наблюдалось отсутствие или довольно низкие титры антител к двуцепочечной ДНК, в то время как титры антител к гистонам значительно возрастали [157]. Тем не менее, стоит напомнить, что пациентов с лекарственной волчанкой исключали из данного исследования на этапе отбора.

Также стоит отметить, что гистоны считаются аларминами, поскольку выделяются из клеток при гибели или стрессе и способны инициировать воспалительный ответ [9, 300], поэтому концентрация антител к данным аларминам также исследована методом ИФА в данной работе. Полученные результаты представлены на Рисунке 13. Такое повышение может быть связано с компенсаторным ответом иммунной системы на появление в кровотоке большого количества антигенов ядерного происхождения, в том числе ДНК, которая способна существовать во внеклеточном пространстве дольше за счёт нахождения в комплексах с различными белками, в том числе гистонами.

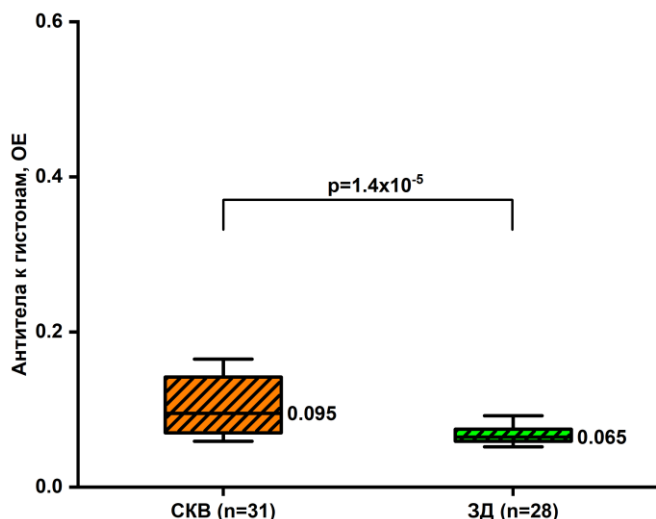


Рисунок 13. Концентрация антител к гистонам в плазме пациентов с системной красной волчанкой (СКВ) и здоровых доноров (ЗД). Горизонтальная полоса внутри «ящика» и значение справа от него – медиана; низ и верх «ящика» – первый и третий квартиль; границы усов – полтора интерквартильных размаха. Статистические различия определяли с помощью U-критерия Манна – Уитни.

Корреляционный анализ между концентрацией антител к гистонам и клиническими проявлениями заболевания не показал значимых результатов. Концентрация антител к гистонам статистически достоверно не коррелировала с тяжестью заболевания, выраженной в баллах по SELENA-SLEDAI ($R_k=0.23$, $p=0.16$). При этом концентрация этих антител прямо коррелировала с титром анти-оцДНК ($R_k=0.39$, $p=0.0026$) и анти-дцДНК ($R_k=0.43$, $p=8.4 \times 10^{-4}$) антител. Такие результаты вполне ожидаемы, так как ДНК зачастую находится в кровотоке в комплексе с различными белками нуклеосом, в частности гистонами [301]. Кроме того, выявлена положительная корреляция между концентрацией антител к гистонам и уровнем TNF α ($R_k=0.22$, $p=0.03$). Эти данные ещё раз подтверждают вовлечённость этих антител в процесс воспалительного ответа при СКВ.

3.3.3. Анти-HMGB1 антитела

Как отмечено в обзоре литературы, в настоящее время известно достаточно мало информации о концентрации антител к HMGB1 при СКВ. А немногочисленные опубликованные данные противоречивы. Результаты анализа, представленные на Рисунке 14, согласуются с результатами работы [158], в которой показано, что концентрация антител к HMGB1 повышается при СКВ.

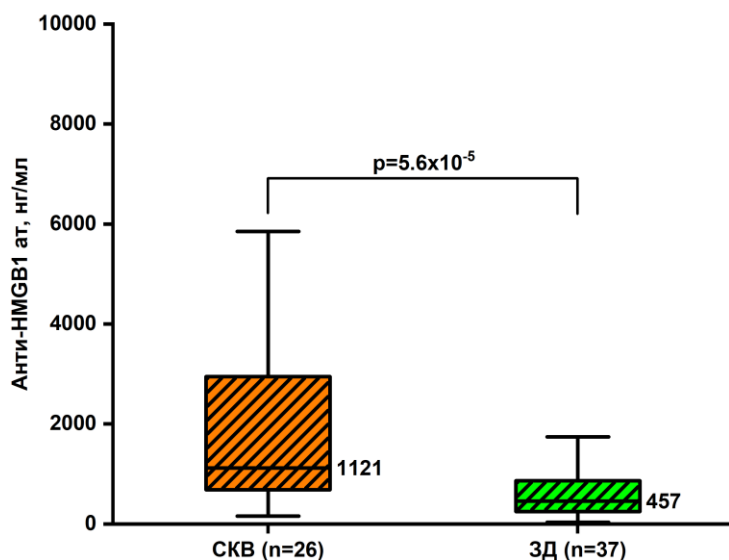


Рисунок 14. Концентрация антител к HMGB1 (анти-HMGB1 ат) в плазме пациентов с системной красной волчанкой (СКВ) и здоровых доноров (ЗД). Горизонтальная полоса внутри «ящика» и значение справа от него – медиана; низ и верх «ящика» – первый и третий квартиль; границы усов – полтора интерквартильных размаха. Статистические различия определяли с помощью U-критерия Манна – Уитни.

В обеих статьях, которые рассматривались в обзоре литературы [158, 159], отмечается положительная корреляция между концентрацией антител к HMGB1 и тяжестью заболевания, выраженной в индексе SELENA-SLEDAI. В настоящем исследовании такой корреляции не обнаружено ($R_k=0.008$, $p=0.96$).

3.3.4. Заключение по разделу

В настоящей работе показано, что у пациентов с СКВ повышается концентрация антител к ДНК (одно- и двуцепочечной) и белкам ядерного происхождения, таким как гистоны и HMGB1, что согласуется с данными литературы. Выявленная корреляция антител к ДНК и к гистонам с уровнем $TNF\alpha$ косвенно подтверждает участие этих антител в воспалительных процессах в организме. Тем не менее, связь с клиническими признаками заболевания обнаружены только для антител к ДНК, что ещё раз подтверждает высокую специфичность таких антител для СКВ.

Информация, представленная в этом разделе, относится к каноническим функциям высокоаффинных антител. В следующем разделе будут представлены результаты изучения неканонической каталитической активности IgG пациентов с СКВ.

3.4. Каталитическая активность антител

3.4.1. Доказательство гомогенности выделенных антител

После выделения иммуноглобулинов класса G из плазмы крови методом аффинной хроматографии, перед дальнейшим анализом каталитической активности антител, нужно убедиться в гомогенности полученных образцов антител. Результаты SDS-PAAG анализа выделенных антител представлены на Рисунке 15. В левой части видны полосы белка на уровне 150 кДа, что соответствует массе целой молекулы IgG [302]. Справа на рисунке видны две полосы, соответствующие лёгкой и тяжёлой цепи IgG после обработки дитиотреитолом. Молекулярная масса соответствует 25 кДа для лёгкой цепи и 50 кДа для тяжёлой [302]. Таким образом, SDS-PAAG анализ подтвердил гомогенность выделенных антител.

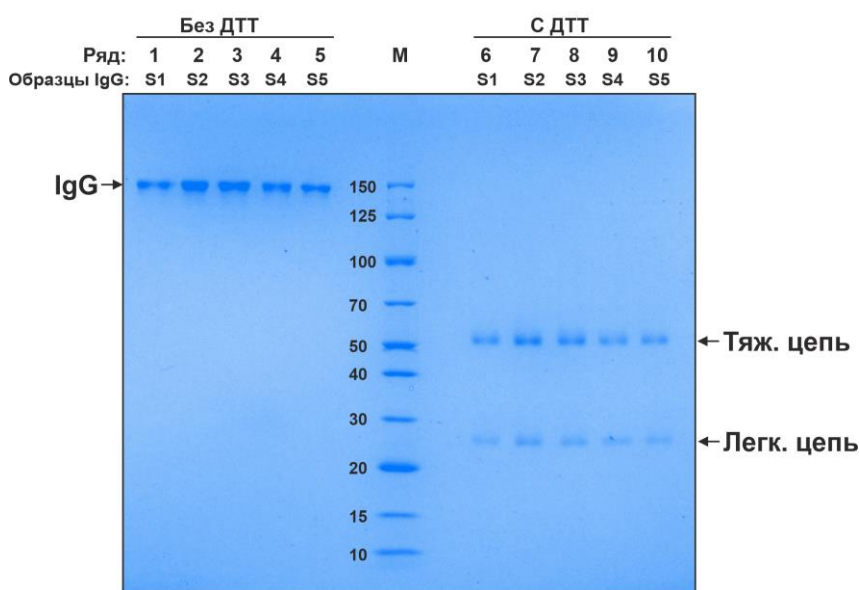


Рисунок 15. Анализ гомогенности IgG, выделенных из плазмы крови пациентов с СКВ, методом SDS PAGE. ДТТ – дитиотреитол; М – молекулярные маркёры; SX – номера препаратов; числа посреди графика – вес молекулярных маркёров в кДа.

3.4.2. ДНК-гидролизующая активность IgG пациентов с СКВ

Иммуноглобулины класса G пациентов с СКВ обладали выраженной ДНК-гидролизующей активностью по сравнению с IgG здоровых доноров. Пример агарозного гель-электрофореза с продуктами реакции представлен на Рисунке 16. Как видно на рисунке, у пациентов с СКВ (верхний форез) наблюдались более выраженные полосы релаксированной ДНК (рДНК), что говорит о разрушении суперскрученной ДНК (ссДНК) антителами. У здоровых же, за исключением одного донора, полосы рДНК примерно

соответствуют контрольным дорожкам (К) (без воздействия IgG). Полученные результаты о повышении ДНК-гидролизующей активности IgG пациентов с СКВ по сравнению со здоровыми донорами соответствуют литературным данным [123, 207].

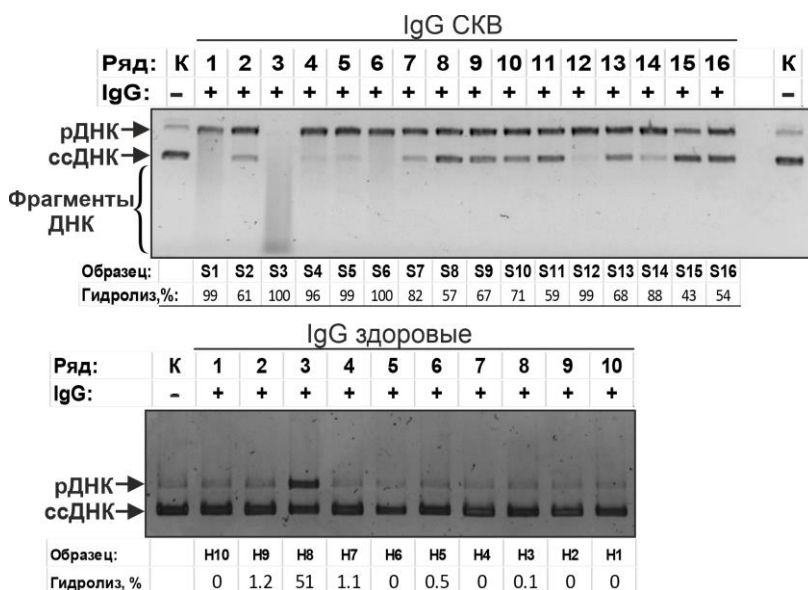


Рисунок 16. Анализ продуктов гидролиза ДНК плазмиды pBluescript в течение 1 ч IgG антителами пациентов с СКВ (верхняя панель) и здоровых дноров (нижняя панель) в 1% агарозном геле. Гидролиз плазмидной ДНК (%) оценивался денситометрически по переходу из суперскрученной (сс) в релаксированную (р) форму и более короткие фрагменты. Полная конверсия ДНК из ссДНК в рДНК принята за 100%. К – контрольные реакции без IgG. Линии, отмеченные номерами, соответствуют реакциям с образцами IgG.

Для доказательства наличия каталитической активности у антител разработан ряд 14 критериев [163, 303, 304, 305, 306, 307]. Основные критерии включают следующее: (1) использование аффинных сорбентов для выделения IgG; (2) отсутствие каталитической активности после сорбции IgG из смеси; (3) различия в уровнях активности IgG между пациентами и здоровыми людьми, если они выделены с использованием одних и тех же методов; (4) наблюдаемые кинетические параметры гидролиза значительно отличаются от параметров классических ферментов; (5) участки расщепления отличаются от участков, характерных для ферментов. Используя эти критерии, многочисленные исследования ранее подтвердили, что антитела обладают рядом каталитических активностей [163, 303, 304, 305, 306, 307]. В данной работе одним из критериев было использование аффинных сорбентов для выделения IgG. Кроме того, проведен анализ по сорбции каталитической активности на аффинном сорбенте (Рисунок 17). Для этого выделенные препараты антител заново подвергли аффинной хроматографии с G-сефарозой, а затем проанализировали полученную фракцию 1 (содержащую несвязавшиеся белки) и фракцию 2 (элюированные с колонки белки). В результате показано, что фракция 1 не обладала ДНК-гидролизующей

активностью, в то время как фракция 2 и исходные образцы IgG обладали ДНКазной активностью. Стоит отметить, что фракция 2 обладала меньшей активностью по сравнению с необработанными антителами, что объясняется жесткими условиями элюции и частичной денатурацией.

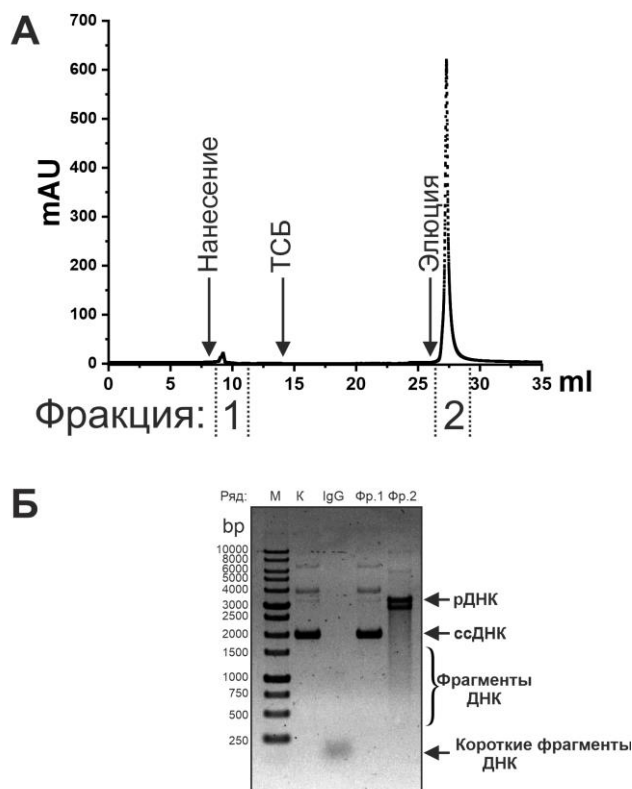


Рисунок 17. Сорбция каталитической активности на аффинном сорбенте. (А) Эквимолярную смесь двух образцов IgG пациентов с СКВ наносили на колонку с рекомбинантным белком G Seplife 4FF (1 мл). Собирали фракцию проскока (Фр. 1), содержащую несвязавшиеся белки. После промывки колонки трис-солевым буфером (ТСБ), IgG элюировали 100 mM Gly-HCl pH 2,6 (Фр. 2). (Б) Анализ гидролиза плазмидной ДНК после 2-ч инкубации с IgG до хроматографии (IgG) и полученными фракциями методом электрофореза в 1% агарозном геле. Гидролиз плазмидной ДНК оценивали по переходу суперскрученной (ссДНК) в релаксированную (рДНК) форму плазмидной ДНК и более короткие фрагменты. Вр – пары оснований.

Таким образом, данный эксперимент позволил продемонстрировать, что сорбция IgG из смеси на аффинном сорбенте приводит к потере каталитической активности. Кроме того, ранее в лаборатории ферментов репарации ИХБФМ СО РАН проверяли другие критерии, которые также позволили подтвердить, что антитела при СКВ обладают рядом каталитических свойств [163, 303, 304, 305, 306, 307].

Анализ уровня удельной ДНКазной активности в выделенных образцах (Рисунок 18) показал, что образцы IgG пациентов с СКВ (медианное значение: 0,348 нМ/ч/мг IgG)

обладают значительно более высокой активностью, чем образцы здоровых лиц (0,011 нМ/ч/мг IgG) ($p=9.7 \times 10^{-10}$). Полученный результат соответствует опубликованным ранее данным о повышении уровня ДНК-гидролизующей активности антител при СКВ по сравнению со здоровыми донорами [121, 207, 308].

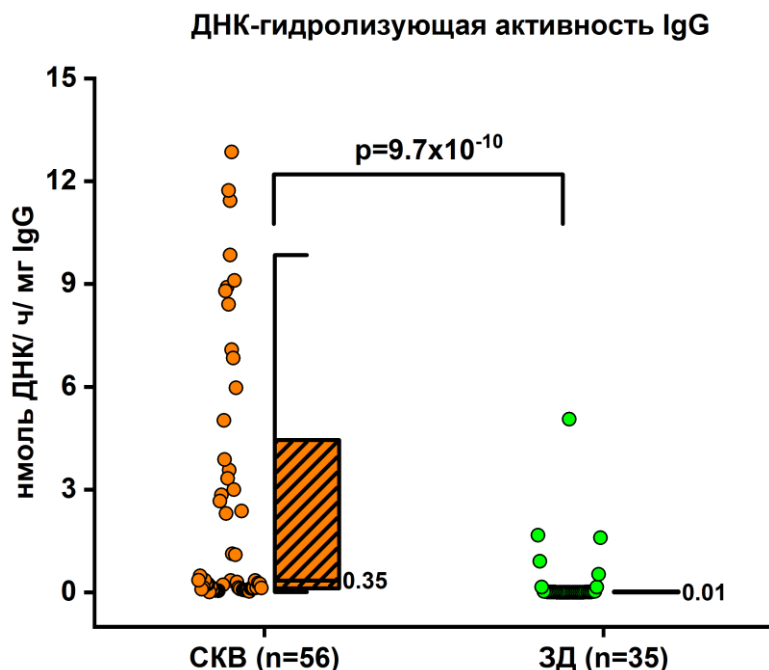


Рисунок 18. Уровень ДНК-гидролизующей активности IgG у пациентов с системной красной волчанкой и здоровых доноров (ЗД). Числа на графике обозначают медианные значения уровня ДНК-гидролизующей активности IgG для соответствующих выборок. Круги на графике обозначают индивидуальные значения для отдельных препаратов. Нижняя граница ящика на графике обозначает первый квартиль выборки, горизонтальная полоса внутри графика – медиана выборки, верхняя граница ящика – третий квартиль выборки, усы ящика – полтора интерквартильных размаха. Статистическую значимость определяли с помощью U-теста Манна – Уитни.

Как видно на рисунке 18, образцы пациентов значительно различались по уровню ДНКазной активности: некоторая часть образцов демонстрировала низкую, но детектируемую активность, а другая часть обладала гораздо большей активностью. Поэтому для дальнейшего анализа пациенты с СКВ разделены на две подгруппы: с высокой и низкой ДНКазной активностью антител. Для стратификации пациентов применен алгоритм пространственной кластеризации приложений с шумом на основе плотности (DBSCAN, от англ. density-based spatial clustering of applications with noise) (Рисунок 19). Алгоритм DBSCAN позволяет выполнять кластеризацию на основе плотности и часто лучше подходит для работы со сложными распределениями данных, чем, например, алгоритм кластеризации К-средних. Анализ гистограммы распределения показал бимодальное распределение, что указывает на существование двух групп в выборке. С

помощью алгоритма DBSCAN рассчитано пороговое значение ($\log_{10}(y) = 0.04$, следовательно, $y = 10^{0.04} = 1,1$ нМ ДНК/ч/мг IgG), на основе которого выборку разделили на две группы: с высокой (ГВА) и низкой (ГНА) ДНКазной активностью IgG. Стоит отметить, что в литературе не удалось найти работ, в которых разделяли пациентов по уровню каталитической активности антител, хотя в работе Pradhan et al. [207] наблюдается схожий разброс значений уровня ДНКазной активности антител (выделяются две группы), что говорит о воспроизводимости феномена. В данной работе впервые проведено сравнение уровня каталитической активности IgG и клинических характеристик пациентов из этих двух подгрупп.

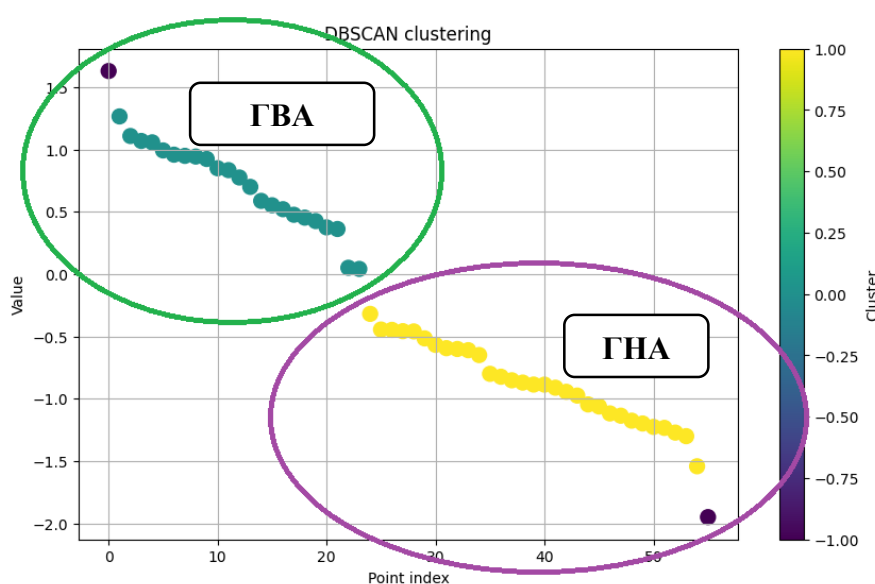


Рисунок 19. Кластеризация пациентов с СКВ на основании уровня ДНК-гидролизующей активности IgG с использованием алгоритма DBSCAN. ГВА – группа высокой активности, обведён зелёным овалом; ГНА – группа низкой активности, обведён фиолетовым овалом.

Сравнение подгрупп ГВА и ГНА пациентов показало, что у пациентов из подгруппы ГВА медианный уровень ДНК-гидролизующей активности IgG примерно в 53.5 раза выше, чем у пациентов из ГНА подгруппы, и в 696 раз выше, чем у здоровых доноров (Рисунок 20). У пациентов из ГНА в свою очередь медианный уровень ДНК-гидролизующей активности IgG в 13 раз выше, чем у здоровых доноров. Большая разница в ДНК-гидролизующей активности антител между ГВА и ГНА может отражаться и на клинических проявлениях заболевания у этих пациентов, о чём будет сказано далее. Наличие такой активности у здоровых доноров, хоть и на небольшом уровне, потенциально указывает на то, что ДНК-гидролизующие антитела могут являться одним из базовых механизмов клиренса клеточного материала, появляющегося в кровотоке после их разрушения.

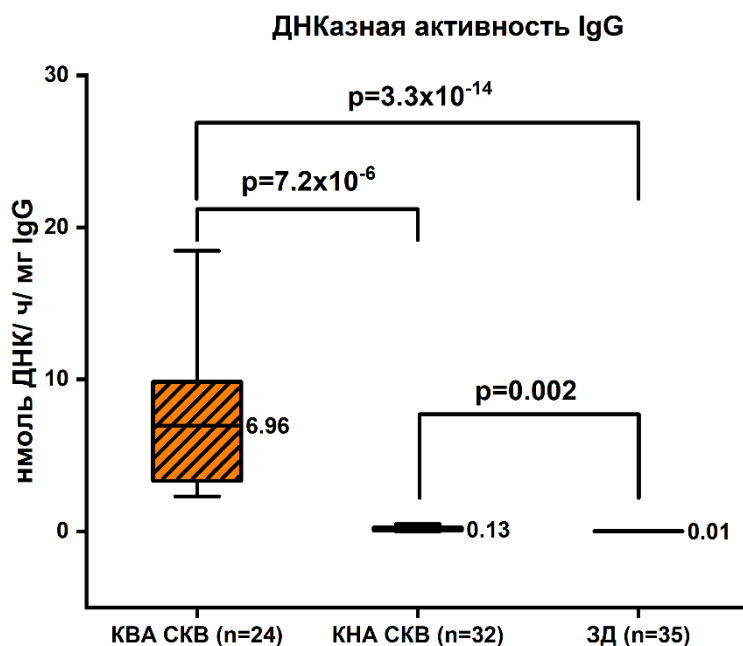


Рисунок 20. Уровень ДНК-гидролизующей активности IgG пациентов из группы высокой активности системной красной волчанки (ГВА СКВ), группы низкой активности системной красной волчанки (ГНА СКВ) и здоровых доноров (ЗД). Числа на графике обозначают медианные значения уровня ДНК-гидролизующей активности IgG для соответствующих выборок. Нижняя граница ящика на графике обозначает первый квартиль выборки, горизонтальная полоса внутри графика – медиана выборки, верхняя граница ящика – третий квартиль выборки, усы ящика – полтора интерквартильных размаха. Статистическую значимость определяли с помощью критерия Краскела – Уоллиса с апостериорным тестом Данна.

Подгруппы пациентов с высоким и низким уровнем ДНКазной активности IgG могли различаться по клиническим проявлениям заболевания, в связи с чем было проведено сравнение клинико-anamnestических данных в подгруппах ГВА и ГНА (Таблица 11). Возраст пациентов в группах не различался. Однако пациенты из подгруппы ГВА характеризовались меньшей продолжительностью заболевания по сравнению с подгруппой ГНА. Показатели индекса SELENA-SLEDAI достоверно не различались. В подгруппе ГВА оказалось больше пациентов с подострым и меньше пациентов с хроническим течением СКВ. Таким образом, пациенты в подгруппе ГВА имели меньшую продолжительность заболевания и преимущественно подострое течение СКВ. При этом у пациентов из подгруппы ГВА концентрации анти-оцДНК и анти-дцДНК антител оказались выше, чем у пациентов из подгруппы ГНА.

Таблица 11. Клиническая характеристика пациентов с СКВ в группах высокой и низкой ДНК-гидролизующей активности IgG.

Параметр	ГВА СКВ (n=24)	ГНА СКВ (n=32)	p-значение
Возраст, лет	48 (41, 58)	53 (41, 61)	0.62
Длительность заболевания, лет	6 (3, 14)	12 (7, 20)	0.03
SELENA-SLEDAI, баллы	6 (4, 8)	8 (5, 10)	0.33
Анти-оцДНК АТ, нг/мл	74 (38, 175)	12 (10, 114)	0.02
Анти-дцДНК АТ, нг/мл	77 (57, 220)	29 (14, 136)	0.04
Течение (острое+ подострое/ хроническое, %)	17%/83%	42%/58%	0.048
Активность заболевания (высокая/ умеренная/ низкая/ минимальная, %)	8%/50%/0%/42%	21%/36%/4%/39%	0.73
Обострения (да/ нет, %)	92%/8%	71%/29%	0.08

Результаты представлены в виде медианы (Q1, Q3) для количественных показателей или в виде относительных частот (%) для категориальных данных. Для оценки значимости различий использовали U-критерий Манна–Уитни для количественных показателей или критерий хи-квадрат для категориальных данных. СКВ – системная красная волчанка; ЗД – здоровые доноры; SELENA-SLEDAI – индекс активности системной красной волчанки; анти-оцДНК АТ – антитела к одноцепочечной ДНК; анти-дцДНК АТ – антитела к двуцепочечной ДНК. Жирным выделены статистически значимые результаты.

Исходя из данных, представленных в Таблице 11, у пациентов из подгруппы ГВА концентрация антител к дцДНК более чем в два раза превосходит концентрацию антител к оцДНК в подгруппе ГНА. Как известно, концентрация антител к дцДНК коррелирует с тяжестью заболевания, выраженной в баллах индекса SELENA-SLEDAI, что показано как в настоящей работе (раздел 3.3.1), так и в литературных источниках [295, 309]. Антитела к оцДНК также оказались повышены более чем в 6 раз у пациентов из подгруппы КВА. Известно, что такие антитела также прямо связаны с тяжестью течения СКВ, хоть и имеют

меньшее клиническое значение [310]. С другой стороны, пациенты из подгрупп ГВА и ГНА не отличаются по тяжести заболевания (по SELENA-SLEDAI). Среди пациентов из подгруппы ГВА меньше, хоть и статистически недостоверно, людей с высокой активностью заболевания, кроме того, среди них статистически значимо меньше людей с острым течением заболевания, чем в подгруппе ГНА.

Далее проводилась оценка связи между уровнем ДНК-гидролизующей активности и тяжестью заболевания, выраженной в баллах по индексу SELENA-SLEDAI. Поскольку в подгруппах ГВА и ГНА оказалось недостаточно пациентов для оценки методом множественной линейной регрессии, анализ проводился для общей группы пациентов ($n=56$). В качестве целевой переменной использовалась шкала SELENA-SLEDAI, предикторы представлены в Таблице 12. Показано, что увеличение ДНКазной активности IgG обратно влияет на индекс SELENA-SLEDAI. Коэффициент регрессии для ДНК-гидролизующей активности составил -0.1004 . Поскольку перед анализом данные логарифмированы, при возвращении в исходную шкалу коэффициент регрессии для ДНКазной активности составил $10^{-0.1004}=0.794$. Это означает, что при увеличении ДНКазной активности на 1 единицу, показатели SELENA-SLEDAI снижались на 20.6%.

Таблица 12. Предикторы SELENA-SLEDAI на основании анализа методом множественной регрессии.

Переменная	β	Стандартная ошибка β	t-статистика	p-значение
ДНК- гидролизующая активность IgG	-0.1004	0.045	-2.232	0.031
Анти-дцДНК АТ	0.1803	0.116	1.556	0.128
Возраст	-0.0075	0.307	-0.025	0.981
Длительность заболевания	-0.1656	0.084	-1.976	0.055

Анти-дцДНК АТ – антитела к двуцепочечной ДНК. Жирным выделены статистически значимые результаты.

Ранее в работе Сучкова с соавторами показана положительная корреляция между ДНК-гидролизующей активностью антител и тяжестью заболевания [219]. В более новой работе Pradhan et al. не обнаружено корреляции между этими параметрами [207]. В настоящей работе выявлена отрицательная связь между этими параметрами (Таблица 12).

Примечательно, что уровень канонических анти-дцДНК антител недостоверно связан с баллами по индексу SELENA-SLEDAI. Эти данные позволяют предположить, что ДНК-гидролизующая активность IgG может компенсировать негативное влияние высокоаффинных анти-дцДНК антител при СКВ.

В разделе 3.3.1, посвящённом анализу корреляции между анти-ДНК антителами и цитокинами показано, что такие антитела прямо коррелируют с такими основополагающими провоспалительными цитокинами, как $\text{TNF}\alpha$ и $\text{IFN}\alpha 2$. Уровень ДНК-гидролизующей активности IgG у пациентов с СКВ положительно коррелировал с титром анти-оцДНК и анти-дцДНК антител (Таблица 13). Эти данные могут указывать на то, что и классические высокоаффинные, и каталитические антитела нарабатываются на одни и те же антигены. При этом, в отличие от классических анти-ДНК антител (Таблица 10), уровень ДНК-гидролизующей активности IgG не коррелировал ни с $\text{TNF}\alpha$, ни с $\text{IFN}\alpha 2$ (Рисунок 21 и Таблица 13), что позволяет предположить малую вовлеченность таких антител в основные воспалительные пути при СКВ, так как $\text{IFN}\alpha 2$, считается основополагающим медиатором аутоиммунного воспаления при СКВ [32].

Таблица 13. Патогенетически важные корреляции между уровнем ДНК-гидролизующей активности, аутоантителами к ДНК и цитокинами

	Анти- оцДНК АТ	Анти- дцДНК АТ	$\text{TNF}\alpha$	$\text{IFN}\alpha 2$	MDC	sCD40L	IL-8	MIP- 1 α
ДНКазная активность АТ	$R_s=0.39$, $p=0.037$	$R_s=0.4$, $p=0.032$	$R_s=-$ 0.06, $p=0.66$	$R_s=-$ 0.1, $p=0.57$	$R_s=-$ 0.35, $p=0.008$	$R_s=-$ 0.42, $p=0.002$	$R_s=-$ 0.27, $p=0.049$	$R_s=-$ 0.3, $p=0.028$

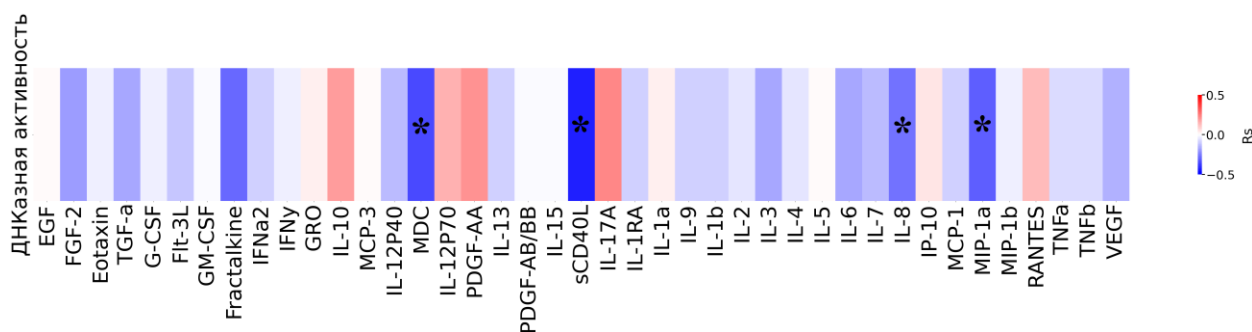


Рисунок 21. Тепловая карта корреляций между ДНКазной активностью IgG и уровнем цитокинов у пациентов с СКВ. Статистически значимые корреляции отмечены «*». Rs – коэффициент корреляции Спирмена. Статистическую значимость оценивали с помощью критерия Спирмена.

Однако для ДНК-гидролизующей активности IgG обнаружены некоторые корреляции с цитокинами, которые наблюдали для антител к ДНК. Выявленная корреляция с MDC и sCD40L может быть связана с теми же причинами, что описаны ранее для анти-ДНК антител. Кроме того, уровень ДНКазной активности антител обратно коррелировал с IL-8 и MIP-1α, которые являются классическими провоспалительными маркерами [311, 312]. Обратная корреляция ДНКазной активности антител с этими хемокинами укладывается в гипотезу о протективной функции этих антител.

3.4.3. Гистон-гидролизующая активность IgG пациентов с СКВ

Образцы IgG также тестировали на их способность гидролизовать гистоны, поскольку эти белки связаны с ДНК, а комплексы ДНК-гистоны могут выступать антигенами для генерации аутоантител [12]. В результате показано, что IgG пациентов с СКВ обладают способностью гидролизовать гистоны H1, H2A, H2B и H4 (Рисунок 22). Инкубация образцов IgG приводила к снижению интенсивности полос гистонов и появлению более коротких фрагментов (продуктов гидролиза). Образцы IgG пациентов с СКВ различались по уровню активности, например, образцы S1, S3 и S6 обладали высоким уровнем активности, причем эти же образцы также обладали высоким уровнем активности в реакции гидролиза ДНК (Рисунок 16). IgG здоровых лиц в целом обладали низкой гистон-гидролизующей активностью (Рисунок 22).

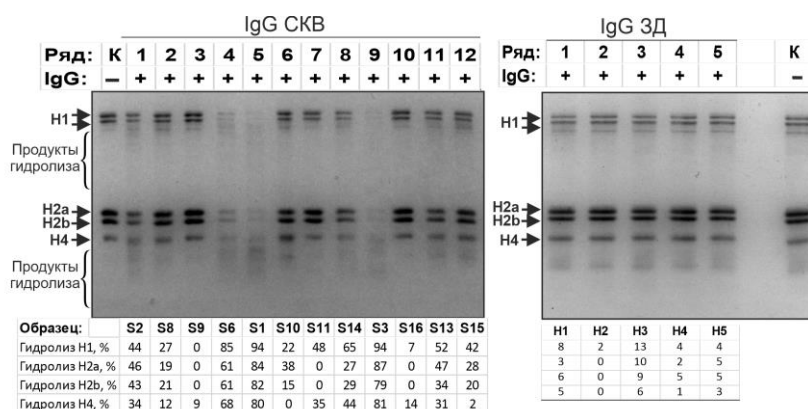


Рисунок 22. Примеры результатов анализа гидролиза гистонов после 25-ч инкубации с образцами IgG пациентов с СКВ (левая панель) и здоровых доноров (ЗД) (правая панель). Образцы разделяли с помощью 15% SDS-ПААГ и визуализировали окрашиванием Кумасси. Показаны полосы, соответствующие гистонам H1, H2a, H2b и H4, а также продукты гидролиза. Дорожки К соответствуют контрольным реакциям без IgG. Дорожки, отмеченные номерами, соответствуют реакциям с образцами IgG. Уровень гидролиза (%) рассчитывали денситометрически в программе Image Lab 6.0 на основе снижения интенсивности по сравнению с контролем.

Количественный анализ удельной активности показал, что уровень гидролиза всех четырёх исследуемых гистонов антителами пациентов с СКВ оказался выше, чем у здоровых доноров (Рисунок 23).

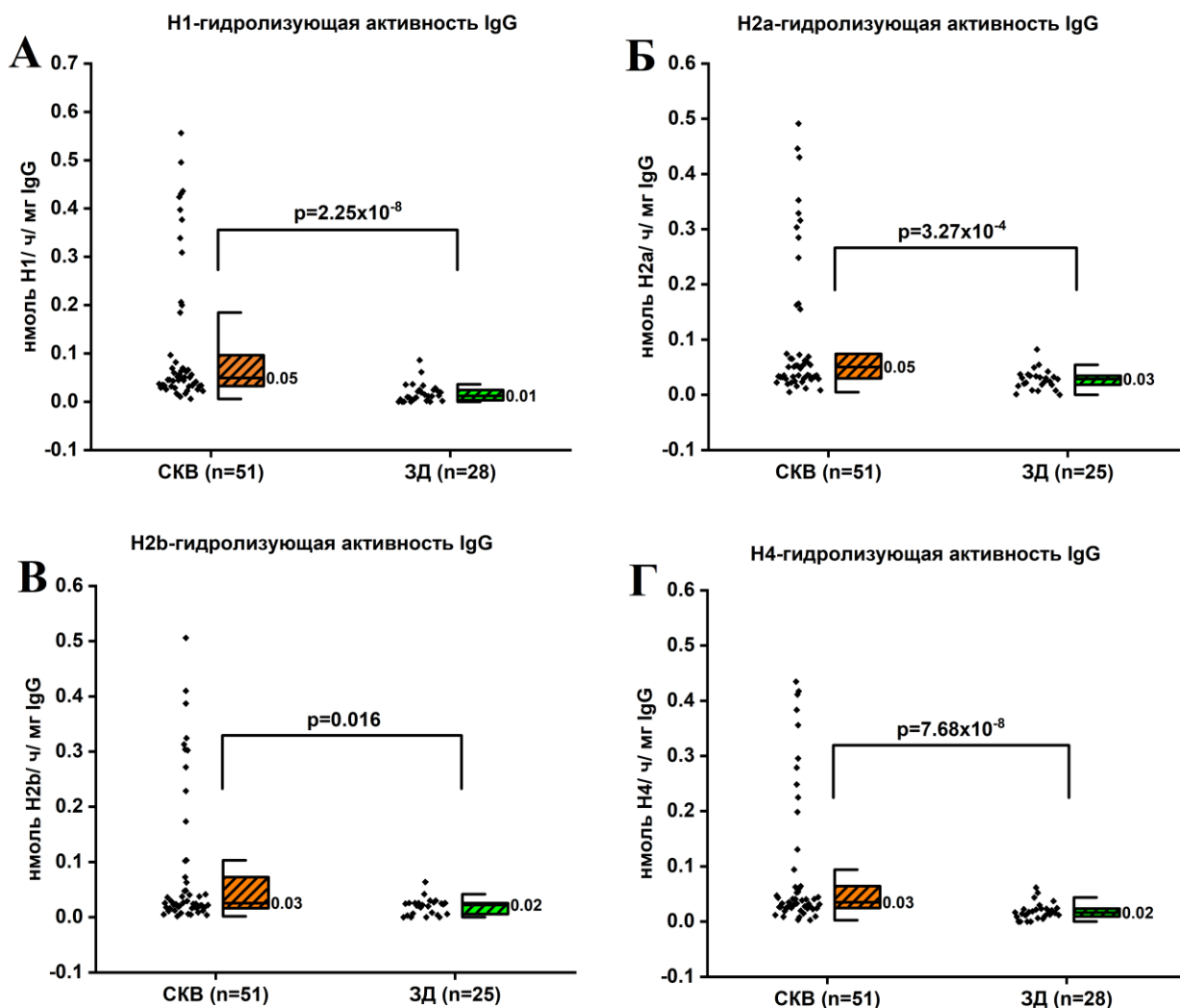


Рисунок 23. Сравнение удельной протеолитической активности при гидролизе различных гистонов образцами IgG пациентов с СКВ и здоровых доноров (ЗД). Числа на графике обозначают медианные значения уровня протеолитической активности IgG для соответствующих выборок. Нижняя граница ящика на графике обозначает первый квартиль выборки, горизонтальная полоса внутри графика – медиана выборки, верхняя граница ящика – третий квартиль выборки, усы ящика – полтора интерквартильных размаха. Статистическую значимость определяли с помощью U-критерия Манна – Уитни.

При изучении взаимоотношений между уровнями гистон-гидролизующей активности против четырёх гистонов и клинико-анамнестическими данными пациентов не обнаружено достоверных корреляций. Однако выявлены сильные прямые корреляции в уровне ДНК- и гистон-гидролизующей активности (Таблица 14). Интересно, что подобные корреляции регистрировались как в общей группе пациентов, так и подгруппе ГВА (Рисунок 19). Однако в подгруппе ГНА и у здоровых доноров такие корреляции пропадали. Можно предположить, что у пациентов из подгруппы ГВА циркулирует значительно больше комплексов ДНК-гистоны, которые обладают высокой иммуногенностью и

формируют широкий антителный ответ за счёт кросс-реактивности или за счёт образования сложных Ig-антигенных комплексов.

Таблица 14. Корреляционная матрица результатов анализа между гистонгидролизующей активностью IgG пациентов с СКВ и здоровых доноров против четырёх гистонов (H1, H2a, H2b, H4) с одной стороны и теми же активностями, а также ДНК-гидролизующей, с другой.

Общая группа СКВ (n=51)				
	H2a	H2b	H4	ДНК
H1	Rs=0.88; p<0.0001	Rs=0.84; p<0.0001	Rs=0.63; p<0.0001	Rs=0.51; p<0.0001
H2a	–	Rs=0.81; p<0.0001	Rs=0.68; p<0.0001	Rs=0.6; p<0.0001
H2b		–	Rs=0.72; p<0.0001	Rs=0.53; p<0.0001
H4			–	Rs=0.4; p=0.007
КБА-СКВ (n=21)				
	H2a	H2b	H4	ДНК
H1	Rs=0.98; p<0.0001	Rs=0.94; p<0.0001	Rs=0.84; p<0.0001	Rs=0.7; p<0.0001
H2a	–	Rs=0.91; p<0.0001	Rs=0.81; p<0.0001	Rs=0.66; p<0.0001
H2b		–	Rs=0.82; p<0.0001	Rs=0.72; p<0.0001
H4			–	Rs=0.55; p=0.009
ГНА-СКВ (n=30)				
	H2a	H2b	H4	ДНК
H1	Rs=0.6; p=0.003	Rs=0.68; p<0.0001	Rs=0.17; p=0.44	Rs=-0.35; p=0.09
H2a	–	Rs=0.62; p=0.002	Rs=0.42; p=0.061	Rs=-0.32; p=0.14
H2b		–	Rs=0.52; p=0.01	Rs=-0.19; p=0.36
H4			–	Rs=-0.27; p=0.22
Здоровые доноры (n=28)				
	H2a	H2b	H4	ДНК
H1	Rs=0.74; p<0.0001	Rs=0.63; p=0.002	Rs=0.73; p<0.0001	Rs=-0.1; p=0.67
H2a	–	Rs=0.84; p<0.0001	Rs=0.6; p=0.004	Rs=-0.18; p=0.47
H2b		–	Rs=0.45; p=0.07	Rs=-0.12; p=0.63
H4			–	Rs=0.08; p=0.73

ГВА – группа высокой активности; ГНА – группа низкой активности; Rs – коэффициент корреляции Спирмена. Значимость различий оценивали с помощью критерия Спирмена. Жирным шрифтом выделены статистически значимые результаты.

3.4.4. HMGB1-гидролизующая активность IgG пациентов с СКВ

В настоящей работе также впервые изучена способность IgG пациентов с СКВ гидролизовать ядерный белок HMGB1, который, наряду с ДНК и гистонами относится к аларминам. Последовательность рекомбинантного белка, использованного для анализа представлена на Рисунке 24А. Известно, что HMGB1 состоит из А-бокса, В-бокса и С-концевого домена [140, 313] (Рисунок 24Б, В). Рекомбинантный HMGB1 мигрировал на электрофореграмме в виде двух полос, соответствующих полноразмерному белку (~23,4 кДа) и, предположительно, фрагменту без А-бокса (~14,2 кДа) (Рисунок 24Г, Д). Вестерн-блот анализ подтвердил, что две наблюдаемые исходные полосы представляют собой фрагменты HMGB1 (Рисунок 24Д). Электрофоретический анализ с окрашиванием Кумасси показал, что некоторые IgG пациентов с СКВ эффективно гидролизуют HMGB1, в то время как IgG здоровых лиц обладают низкой протеолитической активностью (Рисунок 24Г). Некоторые образцы IgG от пациентов с СКВ обладали низкой протеолитической активностью (например, образцы S8 и S9), аналогичную образцам здоровых лиц, тогда как другие образцы гидролизуют HMGB1 очень эффективно (например, образцы S6 и S3) (Рисунок 24Г).

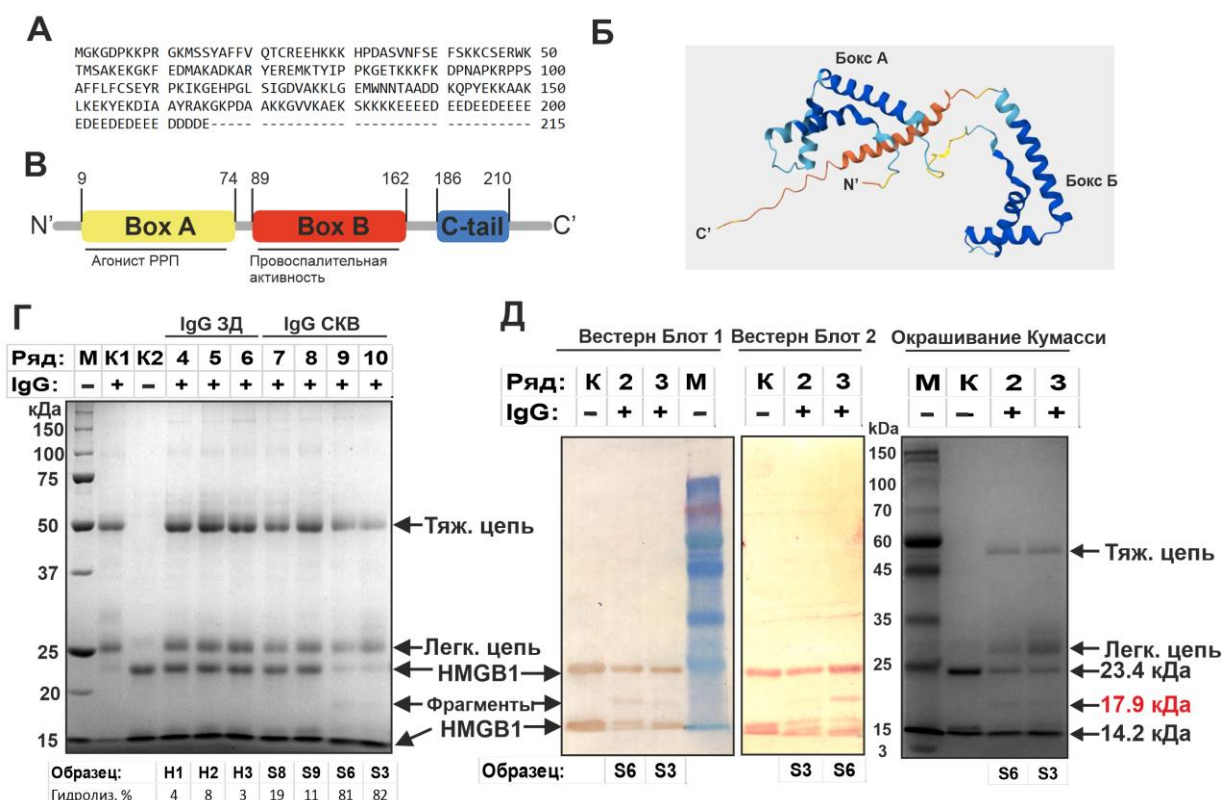


Рисунок 24. Анализ гидролиза HMGB1 антителами пациентов с СКВ. (А) Последовательность рекомбинантного HMGB1, использованного для анализа. (Б) Схематичное изображение доменной структуры полноразмерного HMGB1. (В) Трехмерная

структура полноразмерного HMGB1, предсказанная AlphaFold (идентификатор: AF-P09429-F1-v4). Показатель средней точности структуры на остаток (pLDDT) представлен цветом: синий — очень высокая, голубой — высокая, желтый — низкая и коричневый — очень низкая. (Г) Примеры результатов анализа гидролиза HMGB1 после 17-ч инкубации с образцами IgG пациентов с СКВ (IgG СКВ) и здоровых доноров (IgG 3Д) методом 15% SDS-PAGE с окрашиванием Кумасси. Дорожка K1 — IgG без HMGB1. Дорожка K2 — контрольные реакции без IgG. Дорожки, отмеченные номерами — реакции с образцами IgG. Дорожки M — маркеры молекулярной массы. Видны тяжелая (тяж.) и легкая (легк.) цепи IgG, а также HMGB1 с продуктами гидролиза. Уровень гидролиза (%) рассчитывали денситометрически. (Д) Анализ продуктов гидролиза HMGB1 с помощью вестерн-блоттинга с поликлональными антителами к HMGB1 (левая панель), анти-His-Tag антителами (средняя панель) и окрашивания Кумасси (правая панель). Молекулярные массы фрагментов определяли с использованием Image Lab 6.0. Масса продукта гидролиза HMGB1 показана красным. Дорожки K — контрольные реакции без IgG. Дорожки M — маркеры молекулярной массы.

Вестерн-блот анализ с поликлональными антителами к HMGB1, конъюгированными с пероксидазой хрена, выявил продукт гидролиза HMGB1 с молекулярной массой ~17,9 кДа (Рисунок 24Д, левая панель). Такой продукт гидролиза наблюдался практически во всех образцах IgG с высокой активностью. Вестерн-блот с анти-His-Tag антителами показал, что продукт гидролиза HMGB1 (~17,9 кДа) содержит N-концевой His-Tag (Рисунок 24Д, средняя панель). Расчетная молекулярная масса фрагмента HMGB1, состоящего из А- и В-боксов, должна составлять приблизительно 19,5 кДа. Таким образом, основываясь на этих данных, предполагаемый сайт гидролиза HMGB1 находился в конце В-бокса или в начале линкера между В-боксом и С-хвостом [141]. Также видны другие продукты с массой менее 15 кДа, но их не удалось разделить. Следовательно, могут образоваться и другие сайты гидролиза в других доменах HMGB1. Таким образом, гидролиз HMGB1 образцами IgG приводил к образованию нескольких продуктов. При этом гидролиз в конце В-бокса или начале С-хвоста может указывать на противовоспалительную активность каталитических IgG при СКВ, так как эта часть молекулы HMGB1 отвечает за инициацию воспалительного ответа через рецептор RAGE. При этом, судя по всему, фрагмент молекулы, связывающийся с TLR-4 остаётся интактным, так как он находится в начале В-бокса, что позволяет белку частично сохранить провоспалительную активность [140, 141].

Обнаружено, что у пациентов с СКВ уровень HMGB1-гидролизующей активности IgG статистически достоверно повышен относительно уровня здоровых доноров (Рисунок 25). Такой результат согласуется с полученными ранее в этой работе данными о повышении гистон- и ДНК-гидролизующей активности у пациентов с СКВ, что в свою очередь также согласуется данными литературы [121, 207, 308]. Кроме того, показано, что уровень

HMGB1-гидролизующей активности антител статистически-значимо положительно коррелирует с ДНК- и гистон-гидролизующими активностями IgG в общей группе пациентов с СКВ (Таблица 15), а также в подгруппе КВА. Интересно, что в подгруппе ГНА и у здоровых доноров таких корреляций не обнаружено. Эти данные наводят на мысль о патологическом эффекте комплексообразования ДНК с ядерными белками и их последующей провоспалительной активности, которая может приводить к формированию пула антител с перекрёстной реактивностью или пулов антител с разными каталитическими активностями, синтезируемыми параллельно. В настоящее время всё большее количество исследований, включая работы с моноклональными антителами, показывает, что при СКВ образуются полиреактивные или перекрестно-реагирующие анти-ДНК аутоантитела, распознающие множественные антигены [314, 315, 316]. Можно предположить, что компоненты хроматина, выделяющиеся в том числе в процессе нетоза, могут запускать образование не только высокоаффинных, но и каталитических антител, разрушающих эти алармины при СКВ. Кроме того, высокий уровень гидролитических активностей в подгруппе ГВА может быть связан с компенсаторной реакцией на высокий уровень аларминов в кровотоке.

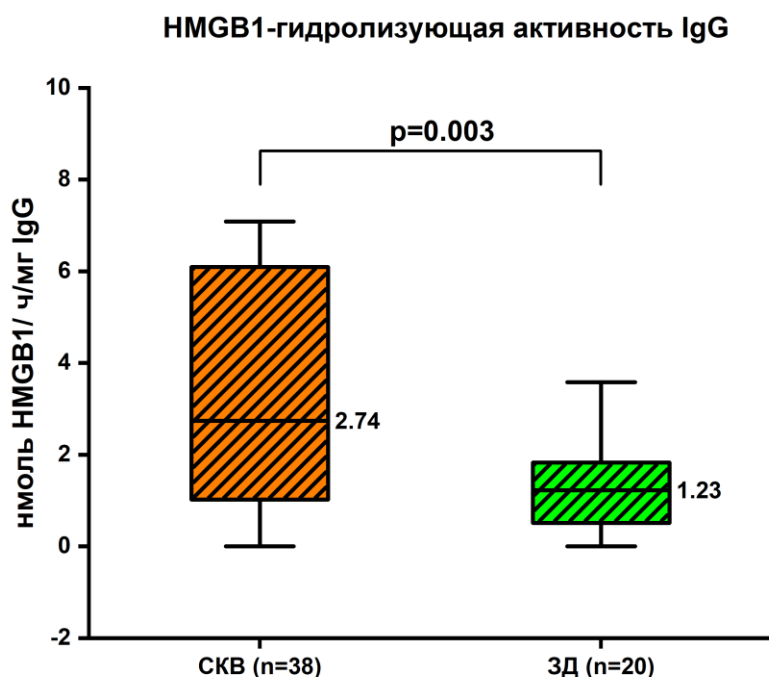


Рисунок 25. Уровень HMGB1-гидролизующей активности IgG у пациентов с системной красной волчанкой (СКВ) и здоровых доноров (ЗД). Числа на графике обозначают медианные значения уровня ДНК-гидролизующей активности IgG для соответствующих выборок. Круги на графике обозначают индивидуальные значения для отдельных препаратов. Нижняя граница ящика на графике обозначает первый квартиль выборки, горизонтальная полоса внутри графика – медиана выборки, верхняя граница ящика – третий

квартиль выборки, усы ящика – полтора интерквартильных размаха. Статистическую значимость определяли с помощью U-теста Манна – Уитни.

Таблица 15. Корреляции между HMGB1-гидролизующей активностью IgG пациентов с СКВ и здоровых доноров и уровнем гидролизующих активностей IgG против ДНК и четырёх гистонов.

Общая группа СКВ					
	ДНК	H1	H2A	H2B	H4
HMGB1	Rs=0.8, p<0.001	Rs=0.66, p<0.001	Rs=0.68, p<0.001	Rs=0.69, p<0.001	Rs=0.53, p=0.01
КВА-СКВ					
HMGB1	Rs=0.85; p<0.0001	Rs=0.8, p<0.0001	Rs=0.74; p=0.002	Rs=0.85; p<0.0001	Rs=0.69; p=0.004
ГНА-СКВ					
HMGB1	Rs=-0.2; p=0.58	Rs=0.5; p=0.25	Rs=0.18; p=0.7	Rs=0.11; p=0.82	Rs=0.07; p=0.88
Здоровые доноры					
HMGB1	Rs=0.37, p=0.16	Rs=-0.1, p=0.82	Rs=-0.39, p=0.38	Rs=-0.43, p=0.34	Rs=-0.45, p=0.26

Rs – коэффициент корреляции Спирмена; ГВА – группа высокой активности; ГНА – группа низкой активности. Статистически значимыми считали результаты с p-значением < 0.05. Статистическую достоверность определяли с помощью критерия Спирмена. Жирным выделены статистически значимые результаты.

3.4.5. Гидролиз TNF- α IgG пациентов с СКВ

Поскольку гистоны и HMGB1 являются ДНК-связывающими белками, решено было проверить IgG-зависимый гидролиз TNF- α в качестве контрольного белка с другими функциями. Известно, что TNF- α является провоспалительным цитокином, не обладающим свойствами связывать ДНК [287]. Он также может присутствовать в крови и быть доступным для антител. Для анализа использовали рекомбинантный TNF- α . TNF- α мигрировал при электрофорезе в виде основной полосы (~19,5 кДа) и двух полос с меньшей массой (Рисунок 26). Вестерн-блот подтвердил, что все наблюдаемые полосы представляют собой фрагменты TNF- α . В результате показано, что образцы IgG от пациентов с СКВ (n = 5) и здоровых доноров (n = 5) не гидролизировали рекомбинантный TNF- α (Рисунок 26), хотя эти образцы эффективно гидролизировали ДНК, гистоны и HMGB1 (образцы S3, S4, S6).

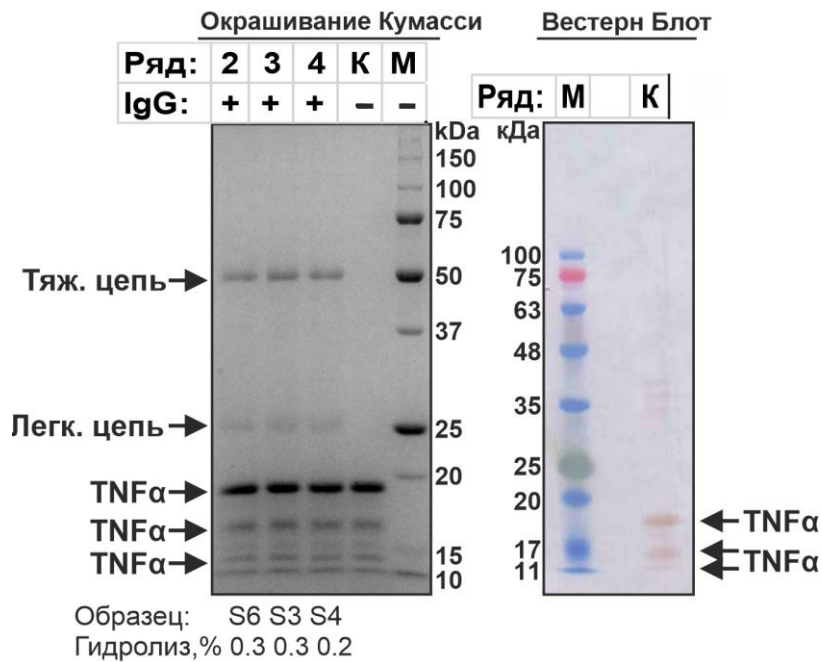


Рисунок 26. SDS-ПААГ (левая панель) и вестерн-блот (правая панель) анализа гидролиза TNF-α после 17 ч инкубации с IgG пациентов с СКВ. Денситометрический анализ показал практически полное отсутствие гидролиза. К – контроль без IgG; М – молекулярные маркёры.

3.4.6. Заключение по разделу

При исследовании каталитической активности IgG пациентов с СКВ получен ряд важных результатов. Во-первых, впервые для этого заболевания выявлена способность IgG гидролизовать HMGB1. Во-вторых, впервые показано, что пациенты с СКВ делятся на две чётко выраженные группы по уровню ДНК-гидролизующей активности: высокой и низкой. Кроме того, обнаружено, что эти группы различаются по некоторым ключевым клиническим характеристикам заболевания. В-третьих, и что намного важнее, показана потенциальная благотворная роль этих антител при СКВ. В частности, обнаружено, что ДНКазная активность IgG пациентов с СКВ отрицательно связана с тяжестью заболевания, выраженной в индексе SELENA-SLEDAI, а пациенты с высоким уровнем ДНКазной активности IgG характеризовались меньшей тяжестью заболевания. Также, получены предварительные данные, что основной сайт гидролиза HMGB1 находится в провоспалительном В-боксе молекулы. В-четвёртых, выявлено, что в отличие от концентрации канонических анти-ДНК антител, уровень ДНК-гидролизующей активности IgG не коррелировал с такими важными провоспалительными цитокинами, как TNFα и IFNα2, что позволяет предположить малую роль таких антител в воспалительных механизмах при СКВ. По совокупности вышеизложенного можно предположить, что IgG с

каталитическими функциями играют благотворную роль при СКВ, благодаря гидролизу хроматин-ассоциированных белков и молекул, выступающих в роли аларминов.

3.5. Анализ динамики концентраций вкДНК и анти-ДНК антител на экспериментальной модели СКВ мышей

При исследовании аларминов и антител к ним у пациентов с СКВ существует ряд ограничений, в связи с чем используются мышинные модели СКВ. Во-первых, как уже упоминалось ранее, концентрация некоторых аларминов, в частности внеклеточной ДНК, может быть крайне изменчивой. На её концентрацию могут влиять сопутствующие заболевания, стресс, физическая нагрузка [317, 318]. В то же время лабораторные животные живут в одинаковых условиях, что позволяет унифицировать влияние среды. Во-вторых, манифестация СКВ, которую можно объективно наблюдать, начинается намного позже, чем формируются патологические сбои в работе иммунной системы. Таким образом, отследить начальные этапы формирования патологии на людях практически невозможно, однако это достаточно просто сделать на лабораторных животных. В-третьих, течение таких заболеваний, как СКВ, длительное, а работа с лабораторными животными позволяет сократить это время до нескольких месяцев. В-четвёртых, и самое главное, это этические ограничения, которые не позволяют выполнять некоторые манипуляции с людьми. Поэтому для изучения изменения концентрации внеклеточной ДНК и её возможной связи с антителами к ДНК в динамике использовали пристан-индуцированную модель СКВ, зарекомендовавшую себя во многих исследованиях [233].

3.5.1. Клиническое течение СКВ-подобного состояния у мышей

У мышей в экспериментальной группе быстро развились симптомы, подобные СКВ у людей. Через пять недель после иммунизации у двух мышей в экспериментальной группе развилась очаговая алопеция. Через двадцать восемь недель после иммунизации у мышей в экспериментальной группе начала выпадать шерсть. Эти изменения у мышей из экспериментальной группы показаны на Рисунке 27.

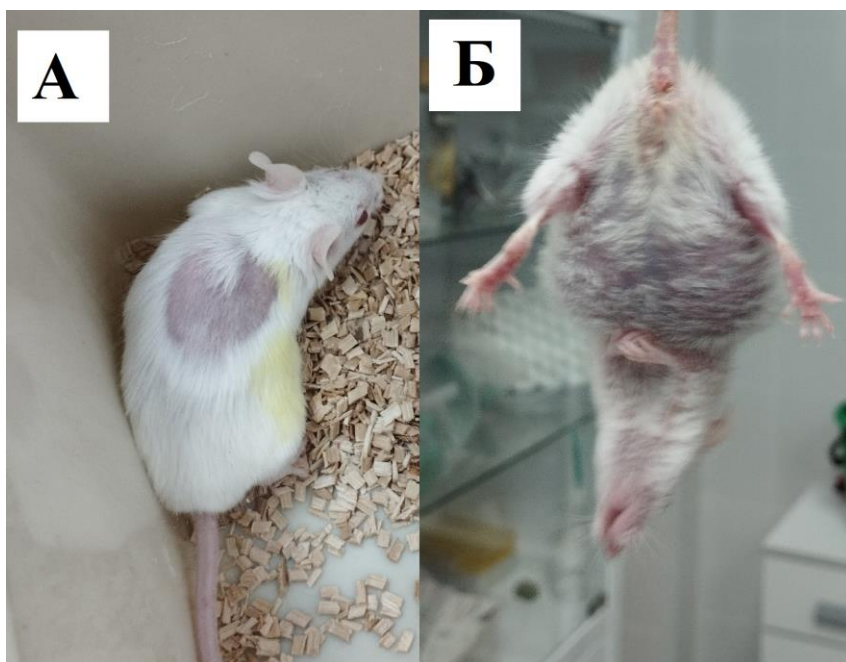


Рисунок 27. Изменения во внешности мышей, ассоциированные с развитием СКВ-подобного состояния. Очаговая алопеция (А), потеря шерстяного покрова и аккумуляция жировой ткани в абдоминальной области (Б).

Кроме того, в ходе исследования обнаружена разница в массе тела между мышами из экспериментальной и контрольной групп (Рисунок 28). Мыши, иммунизированные пристаном, набирали вес быстрее, чем контрольные животные. Начиная с 8 недель после иммунизации, мыши в экспериментальной группе были статистически значимо тяжелее контрольных животных ($p < 0.01$), за исключением периодов в 24 и 26 недель после иммунизации. У них было обнаружено заметное накопление жировой ткани в области живота (Рисунок 27Б).

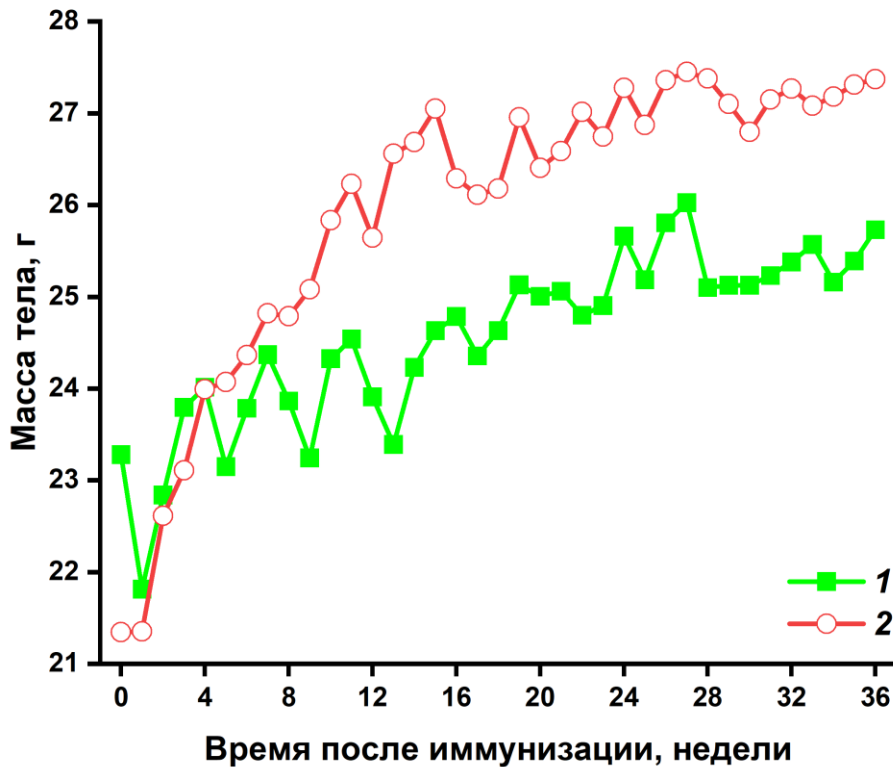


Рисунок 28. Изменение веса в контрольной (1; $n=8$) и экспериментальной (2; $n=12$) группах мышей. Начиная с 8 недели (за исключением недель 24 и 26), различия в массе мышей между группами были статистически значимыми (статистическая значимость на графике не указана). Статистическая значимость различий определялась с помощью U-критерия Манна – Уитни. Статистически значимыми считались различия с p -значением < 0.05 .

Клиническое течение волчаночноподобного состояния у мышей экспериментальной группы согласуется с имеющимися на сегодняшний день литературными данными. Ранее показано, что иммунизация мышей пристаном вызывает алопецию и выпадение шерсти [233]. Поражения кожи также распространены у пациентов с СКВ. Reidin с соавт. обнаружили, что очаговая алопеция ассоциирована с СКВ [319]. В доступной литературе не найдено исследований, посвященных изменениям веса у мышей, иммунизированных пристаном. Однако в исследованиях на предрасположенных к СКВ мышах линии B6.MRL/lpr не наблюдалось значительного увеличения массы тела по сравнению с контрольными мышами C57BL/6 [320]. Возможно, что пристан, как токсичный внешний антиген, вызывает у мышей более выраженный стресс по сравнению с генетической моделью мышей. Этот стресс приводит к избыточному потреблению пищи и, как следствие, к увеличению веса.

3.5.2. Изменение концентрации общей внеклеточной ДНК в плазме крови

В течение первых 8 недель после иммунизации различий в концентрации вкДНК в плазме между экспериментальной и контрольной группами не наблюдалось (Рисунок 29). У мышей, иммунизированных пристаном, уровень вкДНК в плазме резко и достоверно повысился в период с 8 по 14 недели после иммунизации. Затем последовало столь же резкое снижение до исходных значений. Неожиданно, концентрация вкДНК в плазме также повысилась в контрольной группе в период с 8 по 22 недели после иммунизации. После этого также произошло статистически значимое снижение до исходных значений. Разница в общей концентрации вкДНК в плазме между группами не была статистически значимой ни в одной временной точке. Возможные причины увеличения концентрации внеклеточной ДНК в контрольной группе мышей с 8 по 22 неделю (Рисунок 29) будет приведено ниже.

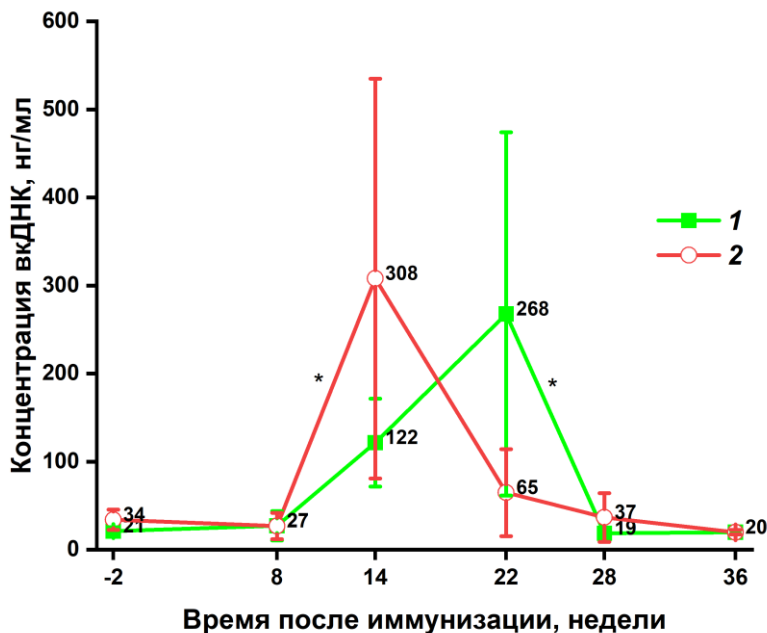


Рисунок 29. Концентрация общей вкДНК в плазме в шести временных точках после иммунизации. Результаты представлены в виде медианных значений. «Усы» на графике обозначают абсолютное медианное отклонение. 1 – контрольная, 2 – экспериментальная группа мышей. Символ * обозначает статистически значимую разницу между соседними временными точками. Статистическая значимость между соседними временными точками внутри одной группы определялась с помощью критерия Уилкоксона. Статистическая значимость между двумя группами в одной временной точке определялась с помощью U-критерия Манна-Уитни.

3.5.3. Связь между внеклеточной ДНК и массой тела у мышей

В ходе исследования изменения концентрации внеклеточной ДНК у мышей из пристан-индуцированной группы сделано ещё одно интересное наблюдение. Оказывается,

увеличение концентрации вкДНК с 0 по 14 неделю эксперимента в плазме имеет статистически значимую прямую корреляцию с набором массы тела у мышей в то же самое время (Рисунок 30). Как видно из Рисунка 28, этот временной промежуток является самым выраженным по набору массы тела у мышей. Выявленная положительная корреляция между увеличением массы тела у экспериментальных мышей и ростом концентрации вкДНК в плазме крови может подтверждать связь между избыточным образованием жировой ткани и усилением воспалительных процессов. Показано, что увеличение веса мышей в экспериментальной группе вызвано, в том числе, ростом количества жировой ткани в абдоминальной области (Рисунок 27Б). У контрольных мышей, которые также набирали вес в процессе созревания, такой корреляции не наблюдалось, что может быть связано с тем, что у них не формировалось избыточных отложений жировой ткани.

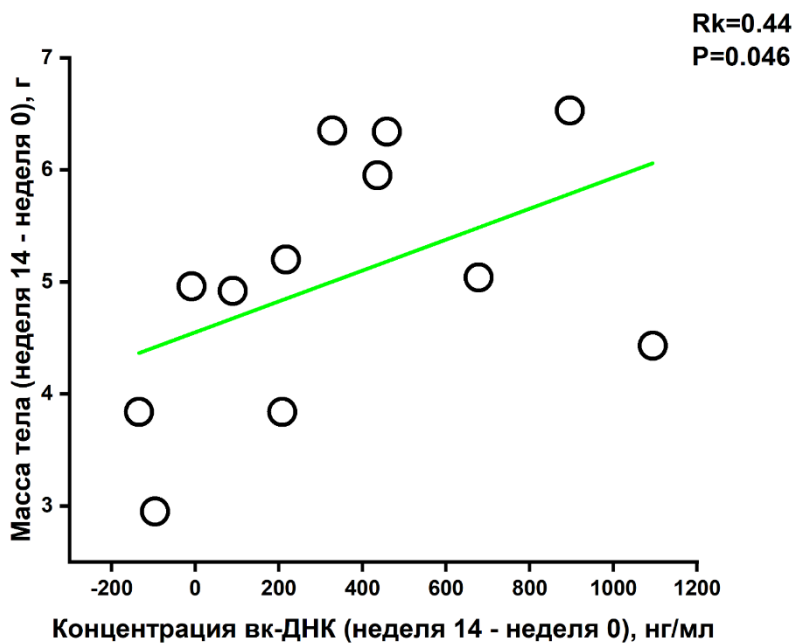


Рисунок 30. Корреляция между абсолютным изменением (дельта) концентрации внеклеточной ДНК и массы тела с 0 по 14 неделю эксперимента. Rk – коэффициент корреляции Кендалла.

На данный момент известна связь между избыточным весом и маркерами воспаления [321]. Однако увеличение веса также может быть индикатором стресса или неспецифической иммунной активации. Прямая корреляция между изменением веса и изменением концентрации вкДНК, обнаруженная в этом исследовании, может быть связана также с нетозом [322]. Нейтрофилы являются важным источником вкДНК, высвобождаемой при нетозе в составе нейтрофильных внеклеточных ловушек. Многочисленные исследования указывают на активацию нетоза, в том числе под действием адипокинов и других медиаторов, у пациентов с ожирением [323, 324]. Таким образом,

усиление нетоза, вызванное ожирением, может быть одной из причин обнаруженной корреляции. Кроме того, известно, что ожирение является фактором, отягощающим течение СКВ [325]. Хотя в литературе не показано связи между избыточным весом и повышением уровня антител к дцДНК, возможно опосредованное влияние через усиление образования вкДНК. Обнаруженная в этом исследовании прямая корреляция уровней вкДНК с увеличением массы тела представляет интерес и требует дальнейшего изучения.

3.5.4. Изменение концентрации антител к двуцепочечной ДНК в плазме крови

У мышей, иммунизированных пристаном, концентрация аутоантител к дцДНК начала повышаться практически сразу, и к 8-й неделе она оказалась статистически значимо выше, чем у здорового контроля ($p = 0.00025$) (Рисунок 31). После этого, в период с 8-й по 22-ю неделю после иммунизации, концентрация аутоантител к дцДНК в плазме мышей, иммунизированных пристаном, незначительно снизилась и вышла на плато. К 22-й неделе после иммунизации статистическая значимость различий между группами исчезла ($p = 0.07$). Начиная с 22-й недели после иммунизации, начался резкий рост концентрации аутоантител к дцДНК в плазме крови мышей как экспериментальной, так и контрольной групп. Уровень аутоантител к дцДНК в экспериментальной группе достиг своего пика на 28-й неделе после иммунизации. В этот момент он снова стал статистически значимо выше, чем в контрольной группе ($p = 0.00045$). Затем концентрация аутоантител к дцДНК в плазме мышей экспериментальной группы начала снижаться. У контрольных мышей концентрация аутоантител к дцДНК была наибольшей через 36 недель после иммунизации. На этом этапе статистически значимое различие между группами снова исчезло ($p = 0.06$).

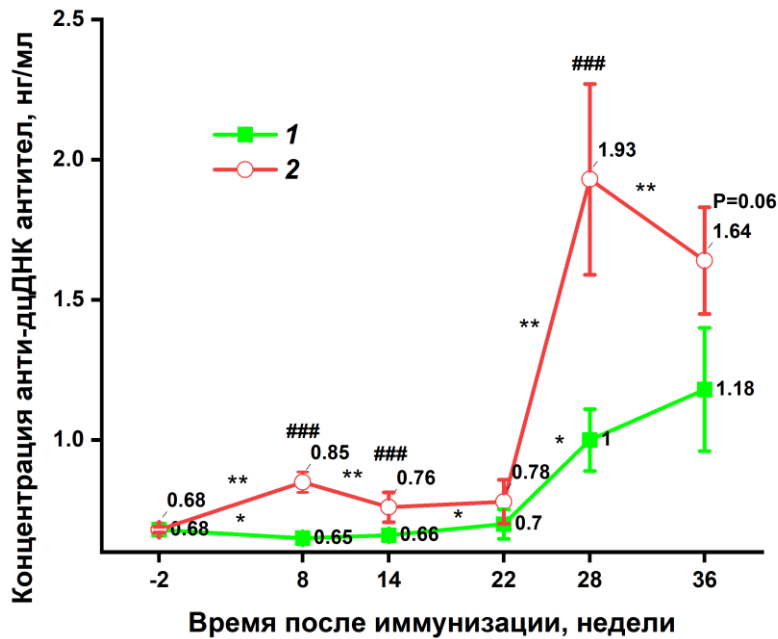


Рисунок 31. Концентрация антител к двуцепочечной ДНК в плазме мышей из контрольной (1) и экспериментальной (2) группы. Результаты представлены в виде медианных значений. «Усы» на графике обозначают абсолютное медианное отклонение. Статистически значимая разница между значениями внутри одной группы в соседних временных точках определялась с помощью критерия Уилкоксона и обозначена знаком *; статистически значимая разница между значениями разных групп в одной временной точке определялась с помощью U-критерия Манна – Уитни и обозначена знаком #. Статистически значимой считались различия с p -значением < 0.05 . *— $0.05 > p > 0.01$; **— $0.01 > p > 0.001$; ###— $p > 0.001$.

Для пристан-индуцированной модели СКВ характерно повышение уровней антител к дцДНК в крови мышей [233, 326]. В настоящей работе выявлено, что концентрация антител к дцДНК в экспериментальной группе становится статистически значимо выше к 8-й неделе исследования, однако резкое увеличение происходит в период между 22-й и 28-й неделями (Рисунок 31). Это наблюдение согласуется с результатами Не и соавт., которые продемонстрировали значительное повышение концентрации антител к дцДНК в крови мышей, иммунизированных пристаном, к 20-й неделе исследования [326]. Другое исследование Liu и соавт. также показало увеличение концентрации антител к дцДНК в крови мышей, иммунизированных пристаном [327]. В настоящей работе рост концентрации начинался в период между 2 и 3 месяцами (8 и 12 недель), а резкий подъем происходил примерно на 5-м месяце исследования (20 недель) (Рисунок 31). Основываясь на данных этого исследования и результатах других работ [326, 327], можно сделать вывод, что наиболее драматичное увеличение титра антител к дцДНК в крови мышей, иммунизированных пристаном, происходит в период с 20-й по 25-ю неделю после иммунизации.

Вопрос, который может возникнуть при анализе результатов, представленных на Рисунке 31, заключается в том, почему у мышей из контрольной группы также повышается концентрация антител к дцДНК. Важно отметить, что с технической точки зрения эксперимент выполнен надлежащим образом: мыши из контрольных и экспериментальных групп содержались в абсолютно одинаковых условиях, поэтому факторы внешней среды вряд ли могли повлиять на образование антител. Обнаруженное в данном исследовании увеличение концентрации антител к дцДНК в крови мышей BALB/c контрольной группы с возрастом довольно сложно сопоставить с литературными данными, поскольку период наблюдения в некоторых работах ограничен 20 [326] и 24 [327] неделями после иммунизации. В настоящем исследовании основное увеличение концентрации антител к дцДНК произошло в период с 22 по 36 недели. Однако в исследовании Liu и соавт. наблюдалось небольшое повышение концентрации антител к дцДНК у контрольных мышей в период между 20 и 24 неделями, но после этого исследование было прекращено [327]. В то же время, на других линиях мышей показано повышение уровня антител к дцДНК с возрастом [328, 329, 330], хотя период наблюдения составлял менее 36 недель. Кроме того, опубликованы данные, что распространенность антител к дцДНК увеличивается с возрастом и у здоровых людей [330, 331]. Таким образом, благодаря длительному дизайну эксперимента, это исследование продемонстрировало усиление образования антител к дцДНК с возрастом у мышей BALB/c, не предрасположенных к спонтанному развитию аутоиммунитета. В целом, эти результаты дополняют существующие данные о повышении уровня аутореактивных антител с возрастом.

3.5.5. Связь между внеклеточной ДНК и антителами к двуцепочечной ДНК

Ни на одной из временных точек не обнаружено статистически значимых корреляций между концентрацией вкДНК и уровнем аутоантител к дцДНК. Однако, как показано на Рисунках 29 и 31, пик образования аутоантител к дцДНК смещался на четырнадцать недель после пика концентрации вкДНК. Это наблюдалось как в экспериментальной группе (недели 28 и 14), так и в контрольной группе (недели 36 и 22). Примечательно, что статистически значимая обратная корреляция обнаружена между абсолютным изменением (дельта) уровней аутоантител к дцДНК в плазме и концентрациями вкДНК у мышей, иммунизированных пристаном, в период с 14 по 28 недели (Рисунок 32). Для контрольной группы такой корреляции не обнаружено, но, как отмечено выше, также наблюдался сдвиг пиков концентрации вкДНК и аутоантител к дцДНК на 14 недель. Таким образом, уровни вкДНК и аутоантител к дцДНК не коррелировали в отдельные временные точки, но изменения уровней этих показателей

коррелировали обратно пропорционально. Другими словами, чем больше увеличивался уровень аутоантител к дцДНК с 14-й по 28-ю неделю исследования, тем сильнее снижалась концентрация вкДНК в плазме мышей, иммунизированных пристаном. Кроме того, проведено исследование связи между изменением концентрации вкДНК и антител к дцДНК с 14 по 28 неделю в экспериментальной группе методом линейной регрессии. Модель оказалась статистически значимой ($p=0.044$), результат представлен на Рисунке 32.

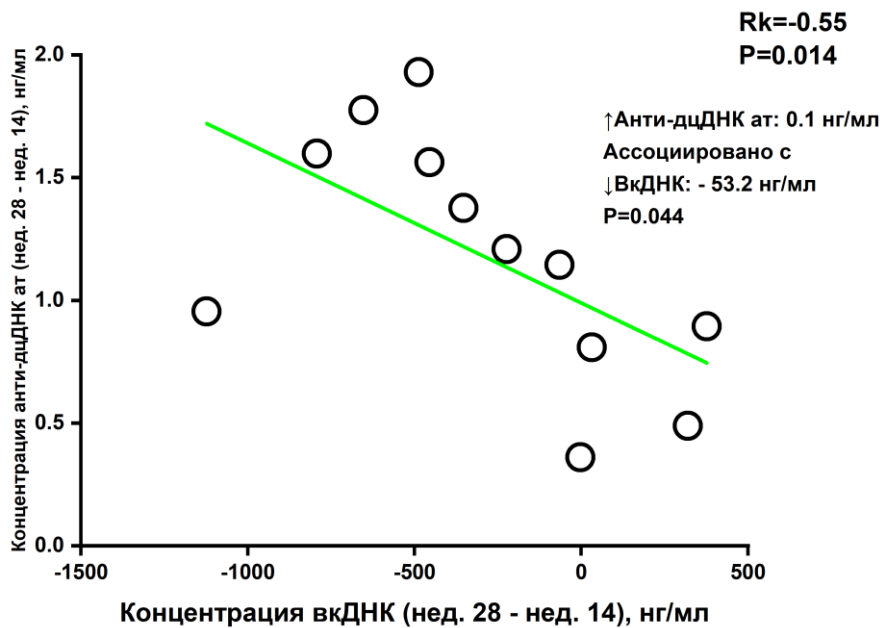


Рисунок 32. Корреляция между абсолютным изменением (дельта) концентрации антител к двуцепочечной ДНК и внеклеточной ДНК с 14 по 28 неделю эксперимента. R_k – коэффициент корреляции Кендалла. Текст под результатами корреляционного анализа является результатом регрессионного анализа, в котором изменение концентрации вкДНК выступала в качестве целевой переменной, а антитела к дцДНК – предиктора.

Обратная корреляция между вкДНК и анти-дцДНК может быть связана с опосредованным антителами клиренсом вкДНК и, как следствие, сокращением периода ее полувыведения. Такие динамические корреляции между изучаемыми параметрами являются более убедительными, чем корреляции в конкретные моменты времени, поскольку уровни антител отражают концентрации антигена в прошлом, а не в настоящем (необходимо время на синтез антител). Однако временной лаг оказался длиннее, чем предполагалось изначально. Поскольку подобные эксперименты ранее не проводились, выдвинута гипотеза, что временной интервал между повышением концентрации вкДНК и анти-дцДНК в крови составит классические 1–2 недели, что характерно как для мышей [332], так и для людей [333]. Но в работе показано, что время ответа составляет около 14 недель в обеих группах мышей. Это оказалось гораздо дольше ожидаемого. Мы предполагаем, что 14-недельная задержка связана с медленным накоплением

иммуностимулирующих комплексов, нарушением Т-клеточного ответа или вовлечением Т-независимых механизмов продукции антител, а также активностью механизмов клиренса ДНК, включая ДНКазы крови, которые фрагментируют ДНК, снижая ее антигенный потенциал. Феномен задержки в образовании антител, возможно, связан с различиями в типе презентации антигена по сравнению с другими моделями СКВ. Наконец, колебания уровней анти-дцДНК могут быть связаны с ограниченностью интервалов отбора проб.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведённое исследование значительно расширяет понимание вовлечённости аларминов и аутоантител в патогенез системной красной волчанки.

Впервые несколько аларминов и маркёров нетоза исследовались одновременно, что позволило осуществить более комплексный подход. Благодаря объединению ряда биомаркёров в рамках одного исследования удалось установить выраженную ассоциацию концентрации аларминов с процессом нетоза при СКВ, что кардинально отличает эту патологию от других ревматических заболеваний, участвовавших в исследовании. Благодаря подробно собранным клинико-анамнестическим данным удалось обнаружить ассоциацию таких важных маркёров нетоза, как миелопероксидазы и цитрулинированного гистона H3 со скоростью клубочковой фильтрации и сердечно-сосудистыми заболеваниями у пациентов с СКВ.

Самым важным результатом исследования можно считать то, что была проведена связь между каталитической активностью антител и клиническими показателями заболевания. Это кардинально отличает настоящее исследование от большинства других работ, в которых заболевание является лишь отдельной характеристикой для антител, а акцент выставляется на их классические биохимические свойства. Подробно собранный клинико-анамнестический анамнез пациентов с СКВ позволил установить обратную связь между уровнем ДНК-гидролизующей активности и тяжестью заболевания, выраженной в индексе SELENA-SLEDAI. Кроме того, в отличие от концентрации антител к двуцепочечной ДНК, для ДНК-гидролизующей активности не было показано положительных корреляций с концентрацией таких важных акторов воспаления при СКВ, как TNF α и IFN γ . Отдельно было показано, что основное место гидролиза HMGB1 лежит в районе его провосполительного бокса. В совокупности это указывает на потенциальную положительную роль антител с каталитической активностью при СКВ.

Эксперимент с пристан-индуцированной моделью СКВ у мышей позволил выявить динамическую взаимосвязь между изменением концентрации внеклеточной ДНК и антител к двуцепочечной ДНК. Такое исследование было проведено впервые, поскольку ранее изучались ассоциации между этими молекулами в конкретных временных точках

5. ВЫВОДЫ

1. При системной красной волчанке выявлено достоверное повышение HMGB1 в 2.5 раза, цитруллинированного гистона H3 в 2 раза и миелопероксидазы в 2.7 раз по сравнению со здоровыми донорами, а также в сравнении с пациентами с другими ревматологическими заболеваниями. Общая и ядерная внеклеточная ДНК многократно повышаются только по сравнению со здоровыми донорами. Связь нетоза с патологическим процессом подтверждается обратной корреляцией между концентрацией миелопероксидазы и скоростью клубочковой фильтрации, а также повышением концентрации этого маркера и цитруллинированного гистона H3 у пациентов с СКВ, с сопутствующими сердечно-сосудистыми заболеваниями.

2. У пациентов с СКВ отмечается повышение по сравнению со здоровыми донорами концентрации антител ко всем исследованным аларминам: оцДНК (в 13 раз) и дцДНК (в 5 раз), гистоны (в 1.5 раза), HMGB1 (в 2.5 раза). Связь с тяжестью заболевания, выраженная в баллах по индексу SELENA-SLEDAI, обнаружена только для антител к ДНК, что демонстрирует их высокую специфичность при этом заболевании.

3. Показано, что IgG пациентов с СКВ гидролизуют ряд субстратов, способных проявлять свойства аларминов: ДНК, гистоны (H1, H2A, H2B, H4), HMGB1. Уровень гидролитической активности IgG пациентов с СКВ оказался достоверно выше, чем здоровых доноров. Установлено, что пациенты с СКВ по уровню ДНК-гидролизующей активности IgG делятся на две подгруппы, отличающиеся по клиническим признакам. Пациенты с высокой ДНКазной активностью IgG отличались тенденцией к снижению тяжести заболевания ($p = 0.08$), выраженного в баллах по SELENA-SLEDAI, а также статистически значимым повышением частоты хронического течения заболевания по сравнению с острым или подострым. Кроме того, ДНК-гидролизующая активность IgG оказалась обратно ассоциирована с тяжестью заболевания, выраженной в баллах по SELENA-SLEDAI. Повышение ДНКазной активности на 1 нмоль ДНК/ч/мг IgG связаны со снижением SELENA-SLEDAI на 20.6%. Эти результаты указывают на то, что антитела с каталитическими активностями могут играть положительную роль в патогенезе СКВ.

4. Анализ ассоциации концентрации цитокинов и аутоантител у пациентов с СКВ показал, что концентрация антител к дцДНК коррелирует с такими важными провоспалительными цитокинами, как $\text{TNF}\alpha$ ($p=0.015$) и $\text{IFN}\alpha 2$ ($p=0.03$). При этом не выявлено прямых корреляций между этими или любыми другими провоспалительными цитокинами и уровнем каталитической активности IgG пациентов с СКВ, что может

указывать на невовлеченность ДНК-гидролизующих антител в провоспалительные процессы при СКВ.

5. На пристан-индуцированной модели СКВ у мышей методами корреляционного анализа и линейной регрессии показана обратная ассоциация между изменениями концентраций внеклеточной ДНК и аутоантител к двуцепочечной ДНК в период между 14 и 28 неделями после иммунизации. Повышение концентрации анти-ДНК антител на 0.1 мг/мл связано со снижением концентрации внеклеточной ДНК на 53.2 нг/мл, демонстрируя динамический характер изменений этих показателей.

6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Global epidemiology of systemic lupus erythematosus / M. R. W. Barber, C. Drenkard, T. Falasinnu [et al.] // *Nature Reviews Rheumatology*. – 2021. – Vol. 17. – № 9. – P. 515-532.
2. Cost of illness in rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis and systemic lupus erythematosus in Germany / D. Huscher, S. Merkesdal, K. Thiele [et al.] // *Annals of the Rheumatic Diseases*. – 2006. – Vol. 65. – № 9. – P. 1175-1183.
3. The economic burden of systemic lupus erythematosus in commercially- and medicaid-insured populations in the United States / A. E. Clarke, J. Yazdany, S. M. Kabadi [et al.] // *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. – 2020. – Vol. 50. – № 4. – P. 759-768.
4. Gender Bias in Human Systemic Lupus Erythematosus: A Problem of Steroid Receptor Action? / V. Rider, N. I. Abdou, B. F. Kimler [и др.] // *Frontiers in Immunology*. – 2018. – Т. 9. – Gender Bias in Human Systemic Lupus Erythematosus. – C. 611.
5. Fatoye, F. Global and regional prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in low-and-middle income countries: a systematic review and meta-analysis / F. Fatoye, T. Gebrye, C. Mbada // *Rheumatology International*. – 2022. – Vol. 42. – Global and regional prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in low-and-middle income countries. – № 12. – P. 2097-2107.
6. Cytokine networks and therapeutic advances in systemic lupus erythematosus / Z. Chen, S. Liu, R. Xie [и др.] // *Frontiers in Immunology*. – 2025. – Т. 16. – C. 1680418.
7. Autoantibodies in Systemic Lupus Erythematosus: Diagnostic and Pathogenic Insights / E. Pagkopoulou, C. Loutradis, M. Papaioannou [et al.] // *Journal of Clinical Medicine*. – 2025. – Vol. 14. – Autoantibodies in Systemic Lupus Erythematosus. – № 16. – P. 5714.
8. Alarmins in autoimmune diseases / M. G. Danieli, E. Antonelli, M. A. Piga [et al.] // *Autoimmunity Reviews*. – 2022. – Vol. 21. – № 9. – P. 103142.
9. Roh, J. S. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases / J. S. Roh, D. H. Sohn // *Immune Network*. – 2018. – Т. 18. – № 4. – C. e27.
10. The Role of NETosis in Systemic Lupus Erythematosus / R. Salemme, L. N. Peralta, S. H. Meka [и др.] // *Journal of Cellular Immunology*. – 2019. – Т. 1. – № 2. – C. 33-42.
11. Life and death of circulating cell-free DNA / A. Kustanovich, R. Schwartz, T. Peretz, A. Grinshpun // *Cancer Biology & Therapy*. – 2019. – Vol. 20. – № 8. – P. 1057-1067.
12. Pisetsky, D. S. Anti-DNA antibodies — quintessential biomarkers of SLE / D. S. Pisetsky // *Nature Reviews Rheumatology*. – 2016. – Vol. 12. – № 2. – P. 102-110.
13. Gómez-Bañuelos, E. An update on autoantibodies in systemic lupus erythematosus / E. Gómez-Bañuelos, A. Fava, F. Andrade // *Current Opinion in Rheumatology*. – 2023. – Vol. 35. – № 2. – P. 61-67.
14. Magna, M. The Alarmin Properties of DNA and DNA-associated Nuclear Proteins / M. Magna, D. S. Pisetsky // *Clinical Therapeutics*. – 2016. – Vol. 38. – № 5. – P. 1029-1041.
15. Circulating Free DNA and Its Emerging Role in Autoimmune Diseases / P. Mondelo-Macía, P. Castro-Santos, A. Castillo-García [et al.] // *Journal of Personalized Medicine*. – 2021. – Vol. 11. – № 2. – P. 151.

16. Hargraves, M. M. Presentation of two bone marrow elements; the tart cell and the L.E. cell / M. M. Hargraves, H. Richmond, R. Morton // *Proceedings of the Staff Meetings. Mayo Clinic.* – 1948. – Т. 23. – № 2. – С. 25-28.
17. Wofsy, D. Successful treatment of autoimmunity in NZB/NZW F1 mice with monoclonal antibody to L3T4. / D. Wofsy, W. E. Seaman // *The Journal of experimental medicine.* – 1985. – Vol. 161. – № 2. – P. 378-391.
18. Weiss, H. J. Of Flies and Men—The Discovery of TLRs / H. J. Weiss, L. A. J. O’Neill // *Cells.* – 2022. – Vol. 11. – № 19. – P. 3127.
19. Sex and Pubertal Differences in the Type 1 Interferon Pathway Associate With Both X Chromosome Number and Serum Sex Hormone Concentration / K. Webb, H. Peckham, A. Radziszewska [и др.] // *Frontiers in Immunology.* – 2019. – Т. 9. – С. 3167.
20. The effect of prolactin on immune cell subsets involved in SLE pathogenesis / M. V. Legorreta-Haquet, P. Santana-Sánchez, L. Chávez-Sánchez, A. K. Chávez-Rueda // *Frontiers in Immunology.* – 2022. – Т. 13. – С. 1016427.
21. Klinefelter’s syndrome (47,XXY) in male systemic lupus erythematosus patients: Support for the notion of a gene-dose effect from the X chromosome / R. H. Scofield, G. R. Bruner, B. Namjou [et al.] // *Arthritis & Rheumatism.* – 2008. – Vol. 58. – Klinefelter’s syndrome (47,XXY) in male systemic lupus erythematosus patients. – № 8. – P. 2511-2517.
22. Control of Toll-like Receptor 7 Expression Is Essential to Restrict Autoimmunity and Dendritic Cell Proliferation / J. A. Deane, P. Pisitkun, R. S. Barrett [et al.] // *Immunity.* – 2007. – Vol. 27. – № 5. – P. 801-810.
23. *TLR7 escapes X chromosome inactivation in immune cells* / M. Souyris, C. Cenac, P. Azar [et al.] // *Science Immunology.* – 2018. – Vol. 3. – № 19. – P. eaap8855.
24. The Inactive X Chromosome: A Genetic Driver of Female-Biased Rheumatic Autoimmune Disorders? / L. Ferrayé, M. Nieucel, M. Savignac [et al.] // *European Journal of Immunology.* – 2025. – Vol. 55. – The Inactive X Chromosome. – № 5. – P. e202451331.
25. Reproductive and menopausal factors and risk of systemic lupus erythematosus in women / K. H. Costenbader, D. Feskanich, M. J. Stampfer, E. W. Karlson // *Arthritis & Rheumatism.* – 2007. – Vol. 56. – № 4. – P. 1251-1262.
26. Risk prediction models for incident systemic lupus erythematosus among women in the Nurses’ health study cohorts using genetics, family history, and lifestyle and environmental factors / J. Cui, S. Malspeis, M. Y. Choi [et al.] // *Seminars in Arthritis and Rheumatism.* – 2023. – Vol. 58. – P. 152143.
27. Familial Aggregation of Systemic Lupus Erythematosus and Coaggregation of Autoimmune Diseases in Affected Families / C.-F. Kuo, M. J. Grainge, A. M. Valdes [et al.] // *JAMA Internal Medicine.* – 2015. – Vol. 175. – № 9. – P. 1518.
28. The Contribution of Major Histocompatibility Complex Class II Genes to an Association with Autoimmune Diseases / M. Yu. Zakharova, T. A. Belyanina, A. V. Sokolov [и др.] // *Acta Naturae.* – 2019. – Т. 11. – № 4. – С. 4-12.
29. Association of the IRF5 risk haplotype with high serum interferon- α activity in systemic lupus erythematosus patients / T. B. Niewold, J. A. Kelly, M. H. Flesch [et al.] // *Arthritis & Rheumatism.* – 2008. – Vol. 58. – № 8. – P. 2481-2487.

30. The genetics and molecular pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE) in populations of different ancestry / G. N. Goulielmos, M. I. Zervou, V. M. Vazgiourakis [et al.] // *Gene*. – 2018. – Vol. 668. – P. 59-72.
31. Novel genetic associations with interferon in systemic lupus erythematosus identified by replication and fine-mapping of trait-stratified genome-wide screen / Y. Ghodke-Puranik, M. Imgruet, J. M. Dorschner [et al.] // *Cytokine*. – 2020. – Vol. 132. – P. 154631.
32. Targeting type I interferons in systemic lupus erythematosus / S. Bruera, T. Chavula, R. Madan, S. K. Agarwal // *Frontiers in Pharmacology*. – 2023. – T. 13. – C. 1046687.
33. Mutation of DNASE1 in people with systemic lupus erythematosus / K. Yasutomo, T. Horiuchi, S. Kagami [et al.] // *Nature Genetics*. – 2001. – Vol. 28. – № 4. – P. 313-314.
34. Deoxyribonuclease 1-Mediated Clearance of Circulating Chromatin Prevents From Immune Cell Activation and Pro-inflammatory Cytokine Production, a Phenomenon Amplified by Low Trap1 Activity: Consequences for Systemic Lupus Erythematosus / J. Felux, A. Erbacher, M. Breckler [и др.] // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – T. 12. – Deoxyribonuclease 1-Mediated Clearance of Circulating Chromatin Prevents From Immune Cell Activation and Pro-inflammatory Cytokine Production, a Phenomenon Amplified by Low Trap1 Activity. – C. 613597.
35. Plasma DNA Profile Associated with DNASE1L3 Gene Mutations: Clinical Observations, Relationships to Nuclease Substrate Preference, and In Vivo Correction / R. W. Y. Chan, L. Serpas, M. Ni [et al.] // *The American Journal of Human Genetics*. – 2020. – Vol. 107. – Plasma DNA Profile Associated with DNASE1L3 Gene Mutations. – № 5. – P. 882-894.
36. Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 are associated with systemic lupus erythematosus / M. A. Lee-Kirsch, M. Gong, D. Chowdhury [и др.] // *Nature Genetics*. – 2007. – T. 39. – № 9. – C. 1065-1067.
37. Evaluation of the TREX1 gene in a large multi-ancestral lupus cohort / B. Namjou, P. H. Kothari, J. A. Kelly [et al.] // *Genes & Immunity*. – 2011. – Vol. 12. – № 4. – P. 270-279.
38. Barbhaiya, M. Environmental exposures and the development of systemic lupus erythematosus / M. Barbhaiya, K. H. Costenbader // *Current Opinion in Rheumatology*. – 2016. – Vol. 28. – № 5. – P. 497-505.
39. DeQuattro, K. Socioeconomic Status, Health Care, and Outcomes in Systemic Lupus Erythematosus / K. DeQuattro, E. Yelin // *Rheumatic Disease Clinics of North America*. – 2020. – Vol. 46. – № 4. – P. 639-649.
40. The role of environmental exposures and gene-environment interactions in the etiology of systemic lupus erythematosus / J. M. P. Woo, C. G. Parks, S. Jacobsen [et al.] // *Journal of Internal Medicine*. – 2022. – Vol. 291. – № 6. – P. 755-778.
41. Low-dose ethanol consumption inhibits neutrophil extracellular traps formation to alleviate rheumatoid arthritis / L. Jin, Z. Zhang, P. Pan [et al.] // *Communications Biology*. – 2023. – Vol. 6. – № 1. – P. 1088.
42. Systemic lupus erythematosus in adults is associated with previous Epstein-Barr virus exposure / J. A. James, B. R. Neas, K. L. Moser [et al.] // *Arthritis & Rheumatism*. – 2001. – Vol. 44. – № 5. – P. 1122-1126.

43. Association of Epstein-Barr virus serological reactivation with transitioning to systemic lupus erythematosus in at-risk individuals / N. R. Jog, K. A. Young, M. E. Munroe [et al.] // *Annals of the Rheumatic Diseases*. – 2019. – Vol. 78. – № 9. – P. 1235-1241.
44. EBV load is associated with cfDNA fragmentation and renal damage in SLE patients / A. Truszevska, A. Wirkowska, K. Gala [et al.] // *Lupus*. – 2021. – Vol. 30. – № 8. – P. 1214-1225.
45. Antibodies Elicited in Response to EBNA-1 May Cross-React with dsDNA / P. Yadav, H. Tran, R. Ebegebe [et al.] // *PLoS ONE*. – 2011. – Vol. 6. – № 1. – P. e14488.
46. Antibodies to an Epstein Barr Virus protein that cross-react with dsDNA have pathogenic potential / D. Singh, O. Oudit, S. Hajtovic [et al.] // *Molecular Immunology*. – 2021. – Vol. 132. – P. 41-52.
47. Epstein-Barr Functional Mimicry: Pathogenicity of Oncogenic Latent Membrane Protein-1 in Systemic Lupus Erythematosus and Autoimmunity / M. E. Munroe, J. R. Anderson, T. F. Gross [и др.] // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Т. 11. – Epstein-Barr Functional Mimicry. – C. 606936.
48. Commensal orthologs of the human autoantigen Ro60 as triggers of autoimmunity in lupus / T. M. Greiling, C. Dehner, X. Chen [et al.] // *Science Translational Medicine*. – 2018. – Vol. 10. – № 434. – P. eaan2306.
49. Risk of QTc Interval Prolongation Associated With Circulating Anti-Ro/SSA Antibodies Among US Veterans: An Observational Cohort Study / P. E. Lazzerini, G. Cevenini, Y. S. Qu [et al.] // *Journal of the American Heart Association*. – 2021. – Vol. 10. – Risk of QTc Interval Prolongation Associated With Circulating Anti-Ro/SSA Antibodies Among US Veterans. – № 4. – P. e018735.
50. Translocation of a gut pathobiont drives autoimmunity in mice and humans / S. Manfredo Vieira, M. Hiltensperger, V. Kumar [et al.] // *Science*. – 2018. – Vol. 359. – № 6380. – P. 1156-1161.
51. Lupus nephritis is linked to disease-activity associated expansions and immunity to a gut commensal / D. Azzouz, A. Omarbekova, A. Heguy [et al.] // *Annals of the Rheumatic Diseases*. – 2019. – Vol. 78. – № 7. – P. 947-956.
52. Association of Ultraviolet B Radiation and Risk of Systemic Lupus Erythematosus Among Women in the Nurses' Health Studies / M. Barbaiya, J. E. Hart, S. Malspeis [et al.] // *Arthritis Care & Research*. – 2023. – Vol. 75. – № 7. – P. 1409-1415.
53. Exploring the correlation between UVB sensitivity and SLE activity: Insights into UVB-driven pathogenesis in lupus erythematosus / J. He, Y. Guo, J. Chen [et al.] // *Journal of Autoimmunity*. – 2025. – Vol. 153. – Exploring the correlation between UVB sensitivity and SLE activity. – P. 103393.
54. Richardson, B. Epigenetically Altered T Cells Contribute to Lupus Flares / B. Richardson // *Cells*. – 2019. – Vol. 8. – № 2. – P. 127.
55. Oxidative Stress, T Cell DNA Methylation, and Lupus / Y. Li, G. Gorelik, F. M. Strickland, B. C. Richardson // *Arthritis & Rheumatology*. – 2014. – Vol. 66. – № 6. – P. 1574-1582.
56. Kawasaki, T. Toll-Like Receptor Signaling Pathways / T. Kawasaki, T. Kawai. – Текст : электронный // *Frontiers in Immunology*. – 2014. – Т. 5. – URL: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00461/abstract> (дата обращения: 14.02.2026).
57. TLR7 gain-of-function genetic variation causes human lupus / G. J. Brown, P. F. Cañete, H. Wang [et al.] // *Nature*. – 2022. – Vol. 605. – № 7909. – P. 349-356.

58. Toll-like receptors 7 and 9 regulate the proliferation and differentiation of B cells in systemic lupus erythematosus / L. Wen, B. Zhang, X. Wu [и др.] // *Frontiers in Immunology*. – 2023. – Т. 14. – С. 1093208.
59. Mitochondrial epigenetics in aging and cardiovascular diseases / A. Mongelli, A. Mengozzi, M. Geiger [и др.] // *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. – 2023. – Т. 10. – С. 1204483.
60. Kubota, T. An Emerging Role for Anti-DNA Antibodies in Systemic Lupus Erythematosus / T. Kubota // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24. – № 22. – P. 16499.
61. Toll-like Receptor 7 and TLR9 Dictate Autoantibody Specificity and Have Opposing Inflammatory and Regulatory Roles in a Murine Model of Lupus / S. R. Christensen, J. Shupe, K. Nickerson [et al.] // *Immunity*. – 2006. – Vol. 25. – № 3. – P. 417-428.
62. TLR9 Regulates TLR7- and MyD88-Dependent Autoantibody Production and Disease in a Murine Model of Lupus / K. M. Nickerson, S. R. Christensen, J. Shupe [et al.] // *The Journal of Immunology*. – 2010. – Vol. 184. – № 4. – P. 1840-1848.
63. Gene expression analysis delineates the potential roles of multiple interferons in systemic lupus erythematosus / M. D. Catalina, P. Bachali, N. S. Geraci [et al.] // *Communications Biology*. – 2019. – Vol. 2. – № 1. – P. 140.
64. Platelet CD154 Potentiates Interferon- α Secretion by Plasmacytoid Dendritic Cells in Systemic Lupus Erythematosus / P. Duffau, J. Seneschal, C. Nicco [et al.]. – Text : electronic // *Science Translational Medicine*. – 2010. – Vol. 2. – № 47. – URL: <https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.3001001> (date accessed: 14.02.2026).
65. Neutrophil extracellular trap induced by HMGB1 exacerbates damages in the ischemic brain / S.-W. Kim, H. Lee, H.-K. Lee [et al.] // *Acta Neuropathologica Communications*. – 2019. – Vol. 7. – № 1. – P. 94.
66. The role of neutrophils and NETosis in lipopolysaccharide exacerbated asthmatic airway inflammation / Q. Qian, Q. Zhao, Y. Qian [и др.] // *Frontiers in Immunology*. – 2025. – Т. 16. – С. 1651085.
67. Neutrophil-plasmacytoid dendritic cell interaction leads to production of type I IFN in response to *Mycobacterium tuberculosis* / A. M. Lee, P. Laurent, C. F. Nathan, F. J. Barrat // *European Journal of Immunology*. – 2024. – Vol. 54. – № 3. – P. 2350666.
68. Knight, J. S. Mechanisms of immunothrombosis and vasculopathy in antiphospholipid syndrome / J. S. Knight, Y. Kanthi // *Seminars in Immunopathology*. – 2022. – Vol. 44. – № 3. – P. 347-362.
69. Self-dsDNA in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus / Y. Bai, Y. Tong, Y. Liu, H. Hu // *Clinical and Experimental Immunology*. – 2017. – Vol. 191. – № 1. – P. 1-10.
70. Mahdi, Z. F. Anti-SSA and Anti-dsDNA Autoantibodies in Rheumatoid Arthritis Patients and their Association with Disease Severity: A Case-Control Study in Kerbala Province / Z. F. Mahdi, S. H. Mohammed, A. R. Hadi // *Al-Rafidain Journal of Medical Sciences (ISSN 2789-3219)*. – 2023. – Т. 5. – Anti-SSA and Anti-dsDNA Autoantibodies in Rheumatoid Arthritis Patients and their Association with Disease Severity. – С. 105-111.
71. Antibodies to native and denatured DNA in the serum of patients with schizophrenia depending on the clinical features of the disease / L. P. Smirnova, E. A. Ermakov, A. S. Boyko [et al.] // *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova*. – 2016. – Vol. 116. – № 4. – P. 47.

72. Comparative evaluation of three anti-dsDNA antibody detection methods in systemic lupus erythematosus: insights from a large monocentric cohort / R. Lu, R. Yu, R. Huang [и др.] // *Frontiers in Immunology*. – 2025. – Т. 16. – Comparative evaluation of three anti-dsDNA antibody detection methods in systemic lupus erythematosus. – С. 1529484.
73. Abnormalities of T cells in systemic lupus erythematosus: new insights in pathogenesis and therapeutic strategies / H. Li, A. Boulougoura, Y. Endo, G. C. Tsokos // *Journal of Autoimmunity*. – 2022. – Vol. 132. – Abnormalities of T cells in systemic lupus erythematosus. – P. 102870.
74. Wyman, B. Metabolic pathways mediate pathogenesis and offer targets for treatment in rheumatic diseases / B. Wyman, A. Perl // *Current Opinion in Rheumatology*. – 2020. – Vol. 32. – № 2. – P. 184-191.
75. The role of mTOR signaling pathway in systemic lupus erythematosus and systemic vasculitis / D. Michailidou, Y. Gartshteyn, A. D. Askanase, A. Perl // *Autoimmunity Reviews*. – 2025. – Vol. 24. – № 11. – P. 103910.
76. mTOR inhibition triggers mitochondrial fragmentation in cardiomyocytes through proteasome-dependent prohibitin degradation and OPA-1 cleavage / H. E. Verdejo, V. Parra, A. Del Campo [et al.] // *Cell Communication and Signaling*. – 2025. – Vol. 23. – № 1. – P. 256.
77. Implications of CD154 and Its Receptors in the Pathogenesis and Treatment of Systemic Lupus Erythematosus / C. C. Allard, S. Salti, W. Mourad, G. S. Hassan // *Cells*. – 2024. – Vol. 13. – № 19. – P. 1621.
78. Kolios, A. G. A. Interleukin-2 and regulatory T cells in rheumatic diseases / A. G. A. Kolios, G. C. Tsokos, D. Klatzmann // *Nature Reviews Rheumatology*. – 2021. – Vol. 17. – № 12. – P. 749-766.
79. Development of Tbet- and CD11c-expressing B cells in a viral infection requires T follicular helper cells outside of germinal centers / W. Song, O. Q. Antao, E. Condif [et al.] // *Immunity*. – 2022. – Vol. 55. – № 2. – P. 290-307.e5.
80. PD-1hiCXCR5⁺ T peripheral helper cells promote B cell responses in lupus via MAF and IL-21 / A. V. Bocharnikov, J. Keegan, V. S. Wacleche [et al.] // *JCI Insight*. – 2019. – Vol. 4. – № 20. – P. e130062.
81. Longitudinal Immune Cell Profiling in Patients With Early Systemic Lupus Erythematosus / T. Sasaki, S. Bracero, J. Keegan [et al.] // *Arthritis & Rheumatology*. – 2022. – Vol. 74. – № 11. – P. 1808-1821.
82. Type I interferons affect the metabolic fitness of CD8⁺ T cells from patients with systemic lupus erythematosus / N. Buang, L. Tapeng, V. Gray [et al.] // *Nature Communications*. – 2021. – Vol. 12. – № 1. – P. 1980.
83. Genetic and physical interaction of the B-cell systemic lupus erythematosus-associated genes BANK1 and BLK / C. Castillejo-López, A. M. Delgado-Vega, J. Wojcik [и др.] // *Annals of the Rheumatic Diseases*. – 2012. – Т. 71. – № 1. – С. 136-142.
84. PTPN22 association in systemic lupus erythematosus (SLE) with respect to individual ancestry and clinical sub-phenotypes / B. Namjou, X. Kim-Howard, C. Sun [и др.] // *PloS One*. – 2013. – Т. 8. – № 8. – С. e69404.
85. Toll-like receptor 7 (TLR7)-driven accumulation of a novel CD11c⁺ B-cell population is important for the development of autoimmunity / A. V. Rubtsov, K. Rubtsova, A. Fischer [et al.] // *Blood*. – 2011. – Vol. 118. – № 5. – P. 1305-1315.

86. Distinct Effector B Cells Induced by Unregulated Toll-like Receptor 7 Contribute to Pathogenic Responses in Systemic Lupus Erythematosus / S. A. Jenks, K. S. Cashman, E. Zumaquero [et al.] // Immunity. – 2018. – Vol. 49. – № 4. – P. 725-739.e6.
87. Satterthwaite, A. B. TLR7 Signaling in Lupus B Cells: New Insights into Synergizing Factors and Downstream Signals / A. B. Satterthwaite // Current Rheumatology Reports. – 2021. – Vol. 23. – TLR7 Signaling in Lupus B Cells. – № 11. – P. 80.
88. Pisetsky, D. S. New insights into the role of antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus / D. S. Pisetsky, P. E. Lipsky // Nature Reviews Rheumatology. – 2020. – Vol. 16. – № 10. – P. 565-579.
89. Anti-CD19 CAR T cell therapy for refractory systemic lupus erythematosus / A. Mackensen, F. Müller, D. Mougiakakos [et al.] // Nature Medicine. – 2022. – Vol. 28. – № 10. – P. 2124-2132.
90. B Cell Kinetics upon Therapy Commencement for Active Extrarenal Systemic Lupus Erythematosus in Relation to Development of Renal Flares: Results from Three Phase III Clinical Trials of Belimumab / I. Parodis, A. Gomez, J. Lindblom [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23. – B Cell Kinetics upon Therapy Commencement for Active Extrarenal Systemic Lupus Erythematosus in Relation to Development of Renal Flares. – № 22. – P. 13941.
91. Kapurniotu, A. The Multitasking Potential of Alarmins and Atypical Chemokines / A. Kapurniotu, O. Gokce, J. Bernhagen // Frontiers in Medicine. – 2019. – T. 6. – C. 3.
92. Alarmins: Feel the Stress / P. Rider, E. Voronov, C. A. Dinarello [et al.] // The Journal of Immunology. – 2017. – Vol. 198. – Alarmins. – № 4. – P. 1395-1402.
93. Yamanishi, K. Alarmins/stressorins and immune dysregulation in intractable skin disorders / K. Yamanishi, Y. Imai // Allergology International. – 2021. – Vol. 70. – № 4. – P. 421-429.
94. Liu, T. HMGB1 in Systemic Lupus Erythematosus / T. Liu, M. Son, B. Diamond // Frontiers in Immunology. – 2020. – T. 11. – C. 1057.
95. Guvatova, Z. G. A receptor for glycation end products (RAGE) is a key transmitter between garb-aging and inflammaging / Z. G. Guvatova, A. Vakhrusheva, A. Moskalev // Ageing Research Reviews. – 2026. – Vol. 113. – P. 102919.
96. Circulating cell free DNA as a predictor of systemic lupus erythematosus severity and monitoring of therapy / O. M. Hendy, T. A. Motalib, M. A. El Shafie [et al.] // Egyptian Journal of Medical Human Genetics. – 2016. – Vol. 17. – № 1. – P. 79-85.
97. High levels of circulating cell-free DNA are a biomarker of active SLE / Y. Xu, Y. Song, J. Chang [et al.] // European Journal of Clinical Investigation. – 2018. – Vol. 48. – High levels of circulating cell-free DNA are a biomarker of active SLE. – № 11. – P. e13015.
98. Exercise intensity and training alter the innate immune cell type and chromosomal origins of circulating cell-free DNA in humans / K. B. Rodrigues, Z. Weng, Z. A. Graham [и др.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2025. – T. 122. – № 3. – C. e2406954122.
99. Cell-free DNA release following psychosocial and physical stress in women and men / A. S. Limberg, F. Berg, E. Köper [и др.] // Translational Psychiatry. – 2025. – T. 15. – № 1. – C. 26.
100. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics / F. Diehl, K. Schmidt, M. A. Choti [et al.] // Nature Medicine. – 2008. – Vol. 14. – № 9. – P. 985-990.

101. Direct measurement of cell-free DNA from serially collected capillary plasma during incremental exercise / S. Breitbach, B. Sterzing, C. Magallanes [et al.] // *Journal of Applied Physiology*. – 2014. – Vol. 117. – № 2. – P. 119-130.
102. Evaluation and comparison of in vitro degradation kinetics of DNA in serum, urine and saliva: A qualitative study / W. Yao, C. Mei, X. Nan, L. Hui // *Gene*. – 2016. – Vol. 590. – Evaluation and comparison of in vitro degradation kinetics of DNA in serum, urine and saliva. – № 1. – P. 142-148.
103. Dynamics and Half-Life of Cell-Free DNA After Exercise: Insights from a Fragment Size-Specific Measurement Approach / R. Yamamoto, H. Asano, R. Tamaki [et al.] // *Diagnostics*. – 2025. – Vol. 15. – Dynamics and Half-Life of Cell-Free DNA After Exercise. – № 1. – P. 109.
104. “Aging Clocks” Based on Cell-Free DNA / A. V. Sergeev, O. V. Kisil, A. A. Eremin [et al.] // *Biochemistry (Moscow)*. – 2025. – Vol. 90. – № S1. – P. S342-S355.
105. Correlation between cell free DNA levels and medical evaluation of disease progression in systemic lupus erythematosus patients / S. Tug, S. Helmig, J. Menke [et al.] // *Cellular Immunology*. – 2014. – Vol. 292. – № 1-2. – P. 32-39.
106. Levels of plasma cell-free DNA and its correlation with disease activity in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus patients / I. T. Abdelal, M. A. Zakaria, D. M. Sharaf, G. M. Elakad // *The Egyptian Rheumatologist*. – 2016. – Vol. 38. – № 4. – P. 295-300.
107. Neutrophil extracellular traps-associated markers are elevated in patients with systemic lupus erythematosus / I. Jeremic, O. Djuric, M. Nikolic [et al.] // *Rheumatology International*. – 2019. – Vol. 39. – № 11. – P. 1849-1857.
108. Cell-free DNA profiling in patients with lupus nephritis / A. Truszevska, A. Wirkowska, K. Gala [et al.] // *Lupus*. – 2020. – Vol. 29. – № 13. – P. 1759-1772.
109. Profile of the Circulating DNA in Apparently Healthy Individuals / J. Beck, H. B. Urnovitz, J. Riggert [et al.] // *Clinical Chemistry*. – 2009. – Vol. 55. – № 4. – P. 730-738.
110. Characterization of circulating DNA in healthy human plasma / N. Suzuki, A. Kamataki, J. Yamaki, Y. Homma // *Clinica Chimica Acta*. – 2008. – Vol. 387. – № 1-2. – P. 55-58.
111. Clinical algorithm model based on cfDNA to predict SLE disease activity / F. Wang, Y. Liu, H.-B. Miao, Z. Chen // *Lupus*. – 2024. – Vol. 33. – № 2. – P. 145-154.
112. Truszevska, A. The role and diagnostic value of cell-free DNA in systemic lupus erythematosus / A. Truszevska, B. Foronczewicz, L. Pączek // *Clinical and Experimental Rheumatology*. – 2017. – T. 35. – № 2. – C. 330-336.
113. Neutrophil extracellular traps in homeostasis and disease / H. Wang, S. J. Kim, Y. Lei [et al.] // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2024. – Vol. 9. – № 1. – P. 235.
114. *Dnase1* -deficient mice spontaneously develop a systemic lupus erythematosus-like disease / E. F. Kenny, B. Raupach, U. Abu Abed [et al.] // *European Journal of Immunology*. – 2019. – Vol. 49. – № 4. – P. 590-599.
115. Characterization of anti-neutrophil extracellular traps (NET) antibodies according to systemic lupus erythematosus clinical phenotypes / D. A. Carrillo-Vázquez, J. T. Balderas-Miranda, R. I. A. Rivera [et al.] // *Immunologic Research*. – 2025. – Vol. 73. – № 1. – P. 79.

116. Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease / C. Lood, L. P. Blanco, M. M. Purmalek [et al.] // *Nature Medicine*. – 2016. – Vol. 22. – № 2. – P. 146-153.
117. Oxidative Damage of DNA Confers Resistance to Cytosolic Nuclease TREX1 Degradation and Potentiates STING-Dependent Immune Sensing / N. Gehrke, C. Mertens, T. Zillinger [et al.] // *Immunity*. – 2013. – Vol. 39. – № 3. – P. 482-495.
118. Cell-Free DNA in the Pathogenesis and Therapy of Non-Infectious Inflammations and Tumors / G. Múzes, B. Bohusné Barta, O. Szabó [et al.] // *Biomedicines*. – 2022. – Vol. 10. – № 11. – P. 2853.
119. TH17 cells promote microbial killing and innate immune sensing of DNA via interleukin 26 / S. Meller, J. Di Domizio, K. S. Voo [et al.] // *Nature Immunology*. – 2015. – Vol. 16. – № 9. – P. 970-979.
120. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury / Q. Zhang, M. Raoof, Y. Chen [et al.] // *Nature*. – 2010. – Vol. 464. – № 7285. – P. 104-107.
121. DNA Hydrolyzing Autoantibodies / A. M. Shuster, G. V. Gololobov, O. A. Kvashuk [et al.] // *Science*. – 1992. – Vol. 256. – № 5057. – P. 665-667.
122. DNA-hydrolysing activity of IgG antibodies from the sera of patients with schizophrenia / E. A. Ermakov, L. P. Smirnova, T. A. Parkhomenko [et al.] // *Open Biology*. – 2015. – Vol. 5. – № 9. – P. 150064.
123. DNA hydrolysing IgG catalytic antibodies: an emerging link between psychoses and autoimmunity / R. Ramesh, A. Sundaresh, R. P. Rajkumar [et al.] // *npj Schizophrenia*. – 2021. – Vol. 7. – DNA hydrolysing IgG catalytic antibodies. – № 1. – P. 13.
124. Cell-free DNA: a metabolic byproduct with diagnostic and prognostic potential in rheumatic disorders / F. Liu, Y. Su, X. Liu [и др.] // *Frontiers in Pharmacology*. – 2025. – T. 16. – Cell-free DNA. – C. 1537934.
125. Endogenously oxidized mitochondrial DNA induces in vivo and in vitro inflammatory responses / L. V. Collins, S. Hajizadeh, E. Holme [et al.] // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2004. – Vol. 75. – № 6. – P. 995-1000.
126. The Mitochondrial Response to DNA Damage / Z. Rong, P. Tu, P. Xu [и др.] // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2021. – T. 9. – C. 669379.
127. Retter, A. “The NET effect”: Neutrophil extracellular traps—a potential key component of the dysregulated host immune response in sepsis / A. Retter, M. Singer, D. Annane // *Critical Care*. – 2025. – Vol. 29. – “The NET effect”. – № 1. – P. 59.
128. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps / S. Yousefi, C. Mihalache, E. Kozłowski [et al.] // *Cell Death & Differentiation*. – 2009. – Vol. 16. – № 11. – P. 1438-1444.
129. Stress and circulating cell-free mitochondrial DNA: A systematic review of human studies, physiological considerations, and technical recommendations / C. Trumpff, J. Michelson, C. J. Lagranha [et al.] // *Mitochondrion*. – 2021. – Vol. 59. – Stress and circulating cell-free mitochondrial DNA. – P. 225-245.
130. Cytoplasmic DNA and AIM2 inflammasome in RA: where they come from and where they go? / C. Xu, W. Jing, C. Liu [и др.] // *Frontiers in Immunology*. – 2024. – T. 15. – Cytoplasmic DNA and AIM2 inflammasome in RA. – C. 1343325.

131. Magna, M. The Alarmin Properties of DNA and DNA-associated Nuclear Proteins / M. Magna, D. S. Pisetsky // *Clinical Therapeutics*. – 2016. – Vol. 38. – № 5. – P. 1029-1041.
132. Damage-associated molecular pattern-activated neutrophil extracellular trap exacerbates sterile inflammatory liver injury / H. Huang, S. Tohme, A. B. Al-Khafaji [et al.] // *Hepatology*. – 2015. – Vol. 62. – № 2. – P. 600-614.
133. Histones trigger sterile inflammation by activating the NLRP 3 inflammasome / R. Allam, M. N. Darisipudi, J. Tschopp, H. Anders // *European Journal of Immunology*. – 2013. – Vol. 43. – Histones trigger sterile inflammation by activating the nlrp3 inflammasome. – № 12. – P. 3336-3342.
134. Quantification of Citrullinated Histone H3 as a Marker for Neutrophil Extracellular Traps Correlated to Clinical Characteristics of Patients with Systemic Lupus Erythematosus / M. Dubaj, I. Homa-Mlak, A. Majdan [et al.] // *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. – 2025. – Vol. 73. – № 1. – P. 20250002.
135. The multifunctional protein HMGB1: 50 years of discovery / D. Tang, R. Kang, H. J. Zeh, M. T. Lotze // *Nature Reviews Immunology*. – 2023. – Vol. 23. – The multifunctional protein HMGB1. – № 12. – P. 824-841.
136. Inhibition of inflammatory liver injury by the HMGB1-A box through HMGB1/TLR-4/NF-κB signaling in an acute liver failure mouse model / L. Luo, S. Wang, B. Chen [и др.] // *Frontiers in Pharmacology*. – 2022. – T. 13. – C. 990087.
137. The C-terminal acidic tail is responsible for the inhibitory effects of HMGB1 on efferocytosis / S. Banerjee, A. Friggeri, G. Liu, E. Abraham // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2010. – T. 88. – № 5. – C. 973-979.
138. Cleavage of HMGB1 by Proteolytic Enzymes Associated with Inflammatory Conditions / A. Sowinska, M. Rensing, L. Klevenvall [и др.] // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – T. 11. – C. 448262.
139. HMGB1 cleavage by complement C1s and its potent anti-inflammatory product / M. Lorvellec, A. Chouquet, J. Koch [и др.] // *Frontiers in Immunology*. – 2023. – T. 14. – C. 1151731.
140. The dual role and therapeutic potential of high-mobility group box 1 in cancer / S.-J. He, J. Cheng, X. Feng [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8. – № 38. – P. 64534-64550.
141. High-mobility group box 1 and its related receptors: potential therapeutic targets for contrast-induced acute kidney injury / C. Mo, Q. Huang, L. Li [et al.] // *International Urology and Nephrology*. – 2024. – Vol. 56. – High-mobility group box 1 and its related receptors. – № 7. – P. 2291-2299.
142. The binding of lupus-derived autoantibodies to the C-terminal peptide (83–119) of the major SmD1 autoantigen can be mediated by double-stranded DNA and nucleosomes / J. W. Dieker, C. C. Van Bavel, G. Riemekasten [et al.] // *Annals of the Rheumatic Diseases*. – 2006. – Vol. 65. – № 11. – P. 1525-1528.
143. The systemic and SmD183-119-autoantigen-specific cytokine memory of Th cells in SLE patients / S. Langer, D. Langnickel, P. Enghard [et al.] // *Rheumatology*. – 2006. – Vol. 46. – № 2. – P. 238-245.
144. Circulating anti-Ro/SSA-antibodies and risk of heart rate-corrected QT interval prolongation: a meta-analysis / P. E. Lazzerini, M. M. Melamud, E. A. Ermakov [et al.] // *European Heart Journal Open*. – 2026. – Circulating anti-Ro/SSA-antibodies and risk of heart rate-corrected QT interval prolongation. – P. oea123.

145. Garcia, D. Diagnosis and Management of the Antiphospholipid Syndrome / D. Garcia, D. Erkan // New England Journal of Medicine. – 2018. – Vol. 378. – № 21. – P. 2010-2021.
146. Complement activation predicts adverse pregnancy outcome in patients with systemic lupus erythematosus and/or antiphospholipid antibodies / M. Y. Kim, M. M. Guerra, E. Kaplowitz [et al.] // Annals of the Rheumatic Diseases. – 2018. – Vol. 77. – № 4. – P. 549-555.
147. Increased levels of circulating DNA in patients with systemic autoimmune diseases: A possible marker of disease activity in Sjögren's syndrome / E. Bartoloni, V. Ludovini, A. Alunno [et al.] // Lupus. – 2011. – Vol. 20. – Increased levels of circulating DNA in patients with systemic autoimmune diseases. – № 9. – P. 928-935.
148. Circulating cell free DNA: a marker to predict the therapeutic response for biological DMARDs in rheumatoid arthritis / T. Hashimoto, K. Yoshida, N. Hashimoto [et al.] // International Journal of Rheumatic Diseases. – 2017. – Vol. 20. – Circulating cell free DNA. – № 6. – P. 722-730.
149. Affinity maturation generates pathogenic antibodies with dual reactivity to DNase1L3 and dsDNA in systemic lupus erythematosus / E. Gomez-Bañuelos, Y. Yu, J. Li [et al.] // Nature Communications. – 2023. – Vol. 14. – № 1. – P. 1388.
150. Emlen, W. DNA-anti-DNA immune complexes. Antibody protection of a discrete DNA fragment from DNase digestion in vitro. / W. Emlen, R. Ansari, G. Burdick // Journal of Clinical Investigation. – 1984. – Vol. 74. – № 1. – P. 185-190.
151. Rekvig, O. P. The dsDNA, Anti-dsDNA Antibody, and Lupus Nephritis: What We Agree on, What Must Be Done, and What the Best Strategy Forward Could Be / O. P. Rekvig // Frontiers in Immunology. – 2019. – T. 10. – The dsDNA, Anti-dsDNA Antibody, and Lupus Nephritis. – C. 1104.
152. Wang, X. Anti-double Stranded DNA Antibodies: Origin, Pathogenicity, and Targeted Therapies / X. Wang, Y. Xia // Frontiers in Immunology. – 2019. – T. 10. – Anti-double Stranded DNA Antibodies. – C. 1667.
153. Correlation Between Quantitative Anti-dsDNA Levels with Severity of Proteinuria in Systemic Lupus Erythematosus Patients / S. Asif, A. Khan, S. Zahoor [et al.] // Reumatología Clínica (English Edition). – 2022. – Vol. 18. – № 8. – P. 464-468.
154. In systemic lupus erythematosus anti-dsDNA antibodies can promote thrombosis through direct platelet activation / I. A. Andrianova, A. A. Ponomareva, E. R. Mordakhanova [et al.] // Journal of Autoimmunity. – 2020. – Vol. 107. – P. 102355.
155. Anti-histones antibodies in systemic lupus erythematosus: prevalence and frequency in neuropsychiatric lupus / X.-Y. Sun, J. Shi, L. Han [и др.] // Journal of Clinical Laboratory Analysis. – 2008. – T. 22. – Anti-histones antibodies in systemic lupus erythematosus. – № 4. – C. 271-277.
156. Allaoui, A. ANTI-HISTONE ANTIBODIES CLINICAL SIGNIFICANCE IN PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS: A MOROCCAN COHORT OF 80 PATIENTS / A. Allaoui, Y. Hirchi, A. Naitlho // The Journal of Rheumatology. – 2025. – Vol. 52. – ANTI-HISTONE ANTIBODIES CLINICAL SIGNIFICANCE IN PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS. – № Suppl 1. – P. 203.1-203.
157. Lee, A. Y. S. Clinical use of anti-histone antibodies in idiopathic and drug-induced lupus / A. Y. S. Lee // Immunological Medicine. – 2022. – Vol. 45. – № 4. – P. 180-185.
158. High mobility group box 1 (HMGB1) and anti-HMGB1 antibodies and their relation to disease characteristics in systemic lupus erythematosus / D. A. Abdulahad, J. Westra, J. Bijzet [et al.] // Arthritis Research & Therapy. – 2011. – Vol. 13. – № 3. – P. R71.

159. Association of anti-CLIC2 and anti-HMGB1 autoantibodies with higher disease activity in systemic lupus erythematosus patients / C. Syahidatulamali, W. Wan Syamimee, Y. N. Azwany [et al.] // *Journal of Postgraduate Medicine*. – 2017. – Vol. 63. – № 4. – P. 257-261.
160. Liu, T. HMGB1 in Systemic Lupus Erythematosus / T. Liu, M. Son, B. Diamond // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – T. 11. – C. 1057.
161. Ermakov, E. A. Immunoglobulins with Non-Canonical Functions in Inflammatory and Autoimmune Disease States / E. A. Ermakov, G. A. Nevinsky, V. N. Buneva // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21. – № 15. – P. 5392.
162. Dimitrov, J. D. Noncanonical Functions of Antibodies / J. D. Dimitrov, S. Lacroix-Desmazes // *Trends in Immunology*. – 2020. – Vol. 41. – № 5. – P. 379-393.
163. Catalytic Hydrolysis of Vasoactive Intestinal Peptide by Human Autoantibody / S. Paul, D. J. Volle, C. M. Beach [et al.] // *Science*. – 1989. – Vol. 244. – № 4909. – P. 1158-1162.
164. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis of Mice: Enzymatic Cross Site-Specific Hydrolysis of H4 Histone by IgGs against Histones and Myelin Basic Protein / A. E. Urusov, K. S. Aulova, P. S. Dmitrenok [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23. – Experimental Autoimmune Encephalomyelitis of Mice. – № 16. – P. 9182.
165. Autoantibodies with enzymatic properties in human autoimmune diseases / B. Wootla, S. Lacroix-Desmazes, A. E. Warrington [et al.] // *Journal of Autoimmunity*. – 2011. – Vol. 37. – № 2. – P. 144-150.
166. High-resolution Crystal Structure of the Fab-fragments of a Family of Mouse Catalytic Antibodies with Esterase Activity / S. N. Ruzheinikov, T. A. Muranova, S. E. Sedelnikova [et al.] // *Journal of Molecular Biology*. – 2003. – Vol. 332. – № 2. – P. 423-435.
167. Catalytic antibody light chain capable of cleaving a chemokine receptor CCR-5 peptide with a high reaction rate constant / Y. Mitsuda, E. Hifumi, K. Tsuruhata [et al.] // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2004. – Vol. 86. – № 2. – P. 217-225.
168. Theory of proteolytic antibody occurrence / S. Paul, Y. Nishiyama, S. Planque, H. Taguchi // *Immunology Letters*. – 2006. – Vol. 103. – № 1. – P. 8-16.
169. Models for antigen receptor gene rearrangement: CDR3 length / R. Saada, M. Weinberger, G. Shahaf, R. Mehr // *Immunology & Cell Biology*. – 2007. – Vol. 85. – Models for antigen receptor gene rearrangement. – № 4. – P. 323-332.
170. Collins, A. M. On being the right size: antibody repertoire formation in the mouse and human / A. M. Collins, K. J. L. Jackson // *Immunogenetics*. – 2018. – Vol. 70. – On being the right size. – № 3. – P. 143-158.
171. Site-directed Mutagenesis of Proteolytic Antibody Light Chain / Q.-S. Gao, M. Sun, A. R. Rees, S. Paul // *Journal of Molecular Biology*. – 1995. – Vol. 253. – № 5. – P. 658-664.
172. Gololobov, G. Innate antibody catalysis / G. Gololobov, M. Sun, S. Paul // *Molecular Immunology*. – 1999. – Vol. 36. – № 18. – P. 1215-1222.
173. A novel molecular analysis of genes encoding catalytic antibodies / D. Le Minoux, A. Mahendra, S. Kaveri [et al.] // *Molecular Immunology*. – 2012. – Vol. 50. – № 3. – P. 160-168.

174. Broadly Distributed Chemical Reactivity of Natural Antibodies Expressed in Coordination with Specific Antigen Binding Activity / S. Planque, H. Taguchi, G. Burr [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – Vol. 278. – № 22. – P. 20436-20443.
175. Catalytic antibody light chain capable of cleaving a chemokine receptor CCR-5 peptide with a high reaction rate constant / Y. Mitsuda, E. Hifumi, K. Tsuruhata [et al.] // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2004. – Vol. 86. – № 2. – P. 217-225.
176. Pollack, S. J. Selective Chemical Catalysis by an Antibody / S. J. Pollack, J. W. Jacobs, P. G. Schultz // *Science*. – 1986. – Vol. 234. – № 4783. – P. 1570-1573.
177. Tramontano, A. Catalytic Antibodies / A. Tramontano, K. D. Janda, R. A. Lerner // *Science*. – 1986. – Vol. 234. – № 4783. – P. 1566-1570.
178. Tramontano, A. Chemical reactivity at an antibody binding site elicited by mechanistic design of a synthetic antigen. / A. Tramontano, K. D. Janda, R. A. Lerner // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1986. – Vol. 83. – № 18. – P. 6736-6740.
179. A Stereospecific Cyclization Catalyzed by an Antibody / A. D. Napper, S. J. Benkovic, A. Tramontano, R. A. Lerner // *Science*. – 1987. – Vol. 237. – № 4818. – P. 1041-1043.
180. Janda, K. D. Antibody Catalysis of a Disfavored Chemical Transformation / K. D. Janda, C. G. Shevlin, R. A. Lerner // *Science*. – 1993. – Vol. 259. – № 5094. – P. 490-493.
181. Smiley, J. A. Selection of catalytic antibodies for a biosynthetic reaction from a combinatorial cDNA library by complementation of an auxotrophic *Escherichia coli*: antibodies for orotate decarboxylation. / J. A. Smiley, S. J. Benkovic // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1994. – Vol. 91. – Selection of catalytic antibodies for a biosynthetic reaction from a combinatorial cDNA library by complementation of an auxotrophic *Escherichia coli*. – № 18. – P. 8319-8323.
182. A bait and switch hapten strategy generates catalytic antibodies for phosphodiester hydrolysis / P. Wentworth, Y. Liu, A. D. Wentworth [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1998. – Vol. 95. – № 11. – P. 5971-5975.
183. Biochemical characterization of selenium-containing catalytic antibody as a cytosolic glutathione peroxidase mimic / L. Ding, Z. Liu, Z. Zhu [et al.] // *Biochemical Journal*. – 1998. – Vol. 332. – № 1. – P. 251-255.
184. Reactive Immunization / P. Wirsching, J. A. Ashley, C.-H. L. Lo [et al.] // *Science*. – 1995. – Vol. 270. – № 5243. – P. 1775-1783.
185. Specific HIV gp120-cleaving Antibodies Induced by Covalently Reactive Analog of gp120 / S. Paul, S. Planque, Y.-X. Zhou [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – Vol. 278. – № 22. – P. 20429-20435.
186. Exceptional Amyloid β Peptide Hydrolyzing Activity of Nonphysiological Immunoglobulin Variable Domain Scaffolds / H. Taguchi, S. Planque, G. Sapparapu [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – Vol. 283. – № 52. – P. 36724-36733.
187. Jerne, N. K. Towards a network theory of the immune system / N. K. Jerne // *Annales D'immunologie*. – 1974. – T. 125C. – № 1-2. – C. 373-389.
188. Monoclonal anti-idiotypic antibodies as functional internal images of enzyme active sites: production of a catalytic antibody with a cholinesterase activity. / L. Izadyar, A. Friboulet, M. H. Remy [et

al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1993. – Vol. 90. – Monoclonal anti-idiotypic antibodies as functional internal images of enzyme active sites. – № 19. – P. 8876-8880.

189. Avelle, B. Functional mimicry: elicitation of a monoclonal antiidiotypic antibody hydrolizing β -lactams / B. Avelle, D. Thomas, A. Friboulet // The FASEB Journal. – 1998. – Vol. 12. – Functional mimicry. – № 11. – P. 1055-1061.

190. Production and characterization of monoclonal anti-idiotypic antibody exhibiting a catalytic activity similar to carboxypeptidase A / R. Hu, G. Y. Xie, X. Zhang [et al.] // Journal of Biotechnology. – 1998. – Vol. 61. – № 2. – P. 109-115.

191. Anti-Idiotypic Antibody Mimics Proteolytic Function of Parent Antigen / N. A. Ponomarenko, D. Pillet, M. Paon [et al.] // Biochemistry. – 2007. – Vol. 46. – № 50. – P. 14598-14609.

192. Krasnorutskii, M. A. Immunization of rabbits with DNase I produces polyclonal antibodies with DNase and RNase activities / M. A. Krasnorutskii, V. N. Buneva, G. A. Nevinsky // Journal of Molecular Recognition. – 2008. – Vol. 21. – № 4. – P. 233-242.

193. Krasnorutskii, M. A. Antibodies against pancreatic ribonuclease A hydrolyze RNA and DNA / M. A. Krasnorutskii, V. N. Buneva, G. A. Nevinsky // International Immunology. – 2008. – Vol. 20. – № 8. – P. 1031-1040.

194. Krasnorutskii, M. A. Immunization of rabbits with DNase II leads to formation of polyclonal antibodies with DNase and RNase activities / M. A. Krasnorutskii, V. N. Buneva, G. A. Nevinsky // International Immunology. – 2009. – T. 21. – № 4. – C. 349-360.

195. Molecular imprint of enzyme active site by camel nanobodies: rapid and efficient approach to produce abzymes with alliinase activity / J.-W. Li, L. Xia, Y. Su [и др.] // The Journal of Biological Chemistry. – 2012. – T. 287. – Molecular imprint of enzyme active site by camel nanobodies. – № 17. – C. 13713-13721.

196. Antibody-mediated catalysis: Induction and therapeutic relevance / A. Mahendra, M. Sharma, D. N. Rao [et al.] // Autoimmunity Reviews. – 2013. – Vol. 12. – Antibody-mediated catalysis. – № 6. – P. 648-652.

197. Lawrence, D. A. Immunomodulation by metals / D. A. Lawrence, M. J. McCabe // International Immunopharmacology. – 2002. – Vol. 2. – № 2-3. – P. 293-302.

198. Fournel, S. Anti-nucleosome antibodies and T-cell response in systemic lupus erythematosus / S. Fournel, S. Muller // Annales De Medecine Interne. – 2002. – T. 153. – № 8. – C. 513-519.

199. Bowen, A. Antibody-Mediated Catalysis in Infection and Immunity / A. Bowen, M. Wear, A. Casadevall // Infection and Immunity. – 2017. – Vol. 85. – № 9. – P. e00202-17.

200. Catalytic Antibodies: Design, Expression, and Their Applications in Medicine / D. Zhao, J. Chen, X. Hu, S. Zhang // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 2023. – Vol. 195. – Catalytic Antibodies. – № 2. – P. 1514-1540.

201. IgG abzymes with peroxidase and oxidoreductase activities from the sera of healthy humans: Oxidoreductase Activities of Human IgGs / A. S. Tolmacheva, E. A. Blinova, E. A. Ermakov [et al.] // Journal of Molecular Recognition. – 2015. – Vol. 28. – IgG abzymes with peroxidase and oxidoreductase activities from the sera of healthy humans. – № 9. – P. 565-580.

202. Identification and Characterization of the Trypanosoma cruzi B-cell Superantigen Tc24 / S. M. Gunter, K. M. Jones, B. Zhan [и др.] // The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. – 2016. – Т. 94. – № 1. – С. 114-121.
203. Secretory immunoglobulin A from human milk hydrolyzes microRNA / I. Y. Kompaneets, E. A. Ermakov, S. E. Sedykh [et al.] // Journal of Dairy Science. – 2020. – Vol. 103. – № 8. – P. 6782-6797.
204. Secretory immunoglobulin A from human milk hydrolyzes 5 histones and myelin basic protein / I. Y. Kompaneets, S. E. Sedykh, V. N. Buneva [и др.] // Journal of Dairy Science. – 2022. – Т. 105. – № 2. – С. 950-964.
205. Characterization and selectivity of catalytic antibodies from human serum with RNase activity / A. Vlassov, C. Florentz, M. Helm [et al.] // Nucleic Acids Research. – 1998. – Vol. 26. – № 23. – P. 5243-5250.
206. Two-step chromatography purification of IgGs possessing sialidase activity from human blood serum / Y. Kit, R. Bilyy, N. Korniy [et al.] // Biomedical Chromatography. – 2015. – Vol. 29. – № 3. – P. 328-332.
207. Catalytic antibodies in patients with systemic lupus erythematosus / V. Pradhan, P. Pandit, P. Surve [и др.] // European Journal of Rheumatology. – 2019. – Т. 5. – № 3. – С. 173-178.
208. Timofeeva, A. M. Systemic lupus erythematosus: Possible localization of trypsin-like and metalloprotease active centers in the protein sequence of the monoclonal light chain (NGTA2-Me-pro-Tr) / A. M. Timofeeva, G. A. Nevinsky // Biotechnology and Applied Biochemistry. – 2020. – Vol. 67. – Systemic lupus erythematosus. – № 6. – P. 946-959.
209. Catalytic heterogeneity of polyclonal DNA-hydrolyzing antibodies from the sera of patients with multiple sclerosis / A. G. Baranovskii, N. A. Ershova, V. N. Buneva [et al.] // Immunology Letters. – 2001. – Vol. 76. – № 3. – P. 163-167.
210. Catalytic properties of IgMs with amyolytic activity isolated from patients with multiple sclerosis / D. R. Ivanen, A. A. Kulminskaya, K. A. Shabalin [и др.] // Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research. – 2004. – Т. 10. – № 8. – С. BR273-280.
211. IgGs-Abzymes from the Sera of Patients with Multiple Sclerosis Recognize and Hydrolyze miRNAs / E. A. Ermakov, E. M. Kabirova, V. N. Buneva, G. A. Nevinsky // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22. – № 6. – P. 2812.
212. Pathogenicity of catalytic antibodies: catalytic activity of Bence Jones proteins from myeloma patients with renal impairment can elicit cytotoxic effects / K. Matsuura, K. Ohara, H. Munakata [и др.] // Biological Chemistry. – 2006. – Т. 387. – Pathogenicity of catalytic antibodies. – № 5. – С. 543-548.
213. Catalytic activity of anti-thyroglobulin antibodies. / L. Li, S. Paul, S. Tyutyulkova [et al.] // The Journal of Immunology. – 1995. – Vol. 154. – № 7. – P. 3328-3332.
214. Novel functional activities of anti-dna autoantibodies from sera of patients with lymphoproliferative and autoimmune diseases / A. V. Kozyr, A. V. Kolesnikov, E. S. Aleksandrova [et al.] // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 1998. – Vol. 75. – № 1. – P. 45-61.
215. Crystal structure of a glycosylated Fab from an IgM cryoglobulin with properties of a natural proteolytic antibody / P. A. Ramsland, S. S. Terzyan, G. Cloud [et al.] // Biochemical Journal. – 2006. – Vol. 395. – № 3. – P. 473-481.

216. Factor VIII Hydrolysis Mediated by Anti-Factor VIII Autoantibodies in Acquired Hemophilia / B. Wootla, S. Dasgupta, J. D. Dimitrov [et al.] // *The Journal of Immunology*. – 2008. – Vol. 180. – № 11. – P. 7714-7720.
217. Constitutive Production of Catalytic Antibodies to a Staphylococcus aureus Virulence Factor and Effect of Infection / E. L. Brown, Y. Nishiyama, J. W. Dunkle [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2012. – Vol. 287. – № 13. – P. 9940-9951.
218. Significance of anti-myelin basic protein antibodies for ocular hydrodynamic disturbances in primary open-angle glaucoma / M. A. Frolov, V. G. Likhvantseva, I. V. Kovelanova, M. V. Solomatina // *Vestnik oftal'mologii*. – 2017. – Vol. 133. – № 3. – P. 37.
219. [DNA-abzymes and their clinical significance in systemic lupus erythematosus] / S. V. Suchkov, A. G. Gabibov, Z. S. Alekberova, N. V. Gnuchev // *Terapevticheskii Arkhiv*. – 2001. – T. 73. – № 10. – C. 58-65.
220. Production of Abzymes in Th, CBA, and C57BL/6 Mice before and after MOG Treatment: Comparing Changes in Cell Differentiation and Proliferation / K. S. Aulova, A. E. Urusov, L. B. Toporkova [et al.] // *Biomolecules*. – 2019. – Vol. 10. – Production of Abzymes in Th, CBA, and C57BL/6 Mice before and after MOG Treatment. – № 1. – P. 53.
221. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis of Mice: IgGs from the Sera of Mice Hydrolyze miRNAs / G. A. Nevinsky, A. E. Urusov, K. S. Aulova, E. A. Ermakov // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24. – Experimental Autoimmune Encephalomyelitis of Mice. – № 5. – P. 4433.
222. Antibody-mediated catalysis: Induction and therapeutic relevance / A. Mahendra, M. Sharma, D. N. Rao [et al.] // *Autoimmunity Reviews*. – 2013. – Vol. 12. – Antibody-mediated catalysis. – № 6. – P. 648-652.
223. Natural Antibodies: from First-Line Defense Against Pathogens to Perpetual Immune Homeostasis / M. S. Maddur, S. Lacroix-Desmazes, J. D. Dimitrov [et al.] // *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. – 2020. – Vol. 58. – Natural Antibodies. – № 2. – P. 213-228.
224. Effect of different drugs on the level of DNA-hydrolyzing polyclonal IgG antibodies in sera of patients with Hashimoto's thyroiditis and nontoxic nodal goiter / G. A. Nevinsky, A. A. Breusov, A. G. Baranovskii [и др.] // *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. – 2001. – T. 7. – № 2. – C. 201-211.
225. DNA-hydrolyzing autoantibodies / A. G. Gabibov, G. V. Gololobov, O. I. Makarevich [et al.] // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 1994. – Vol. 47. – № 2-3. – P. 293-303.
226. Amylolytic activity of IgM and IgG antibodies from patients with multiple sclerosis / A. N. Saveliev, D. R. Ivanen, A. A. Kulminskaya [et al.] // *Immunology Letters*. – 2003. – Vol. 86. – № 3. – P. 291-297.
227. Wöhner, M. Cytotoxic IgG: Mechanisms, functions, and applications / M. Wöhner, F. Nimmerjahn // *Immunity*. – 2025. – Vol. 58. – Cytotoxic IgG. – № 6. – P. 1378-1395.
228. Autoantibodies from SLE patients induce programmed cell death in murine fibroblast cells through interaction with TNFR1 receptor / T. N. Sharapova, E. A. Romanova, N. V. Soshnikova [et al.] // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 11144.
229. ДНКазная активность IgG антител, содержащих легкие цепи I- и K-типа, а так же подклассов IgG1-IgG4 у больных некоторыми инфекционными заболеваниями / Т. А. Пархоменко,

В. Н. Бунева, Е. В. Кундер [и др.] // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2010. – № 2. – С. 99-109.

230. Role of IgG4 Antibodies in Human Health and Disease / L. Shi, P. Xiong, M. Yang [et al.] // Cells. – 2025. – Vol. 14. – № 9. – P. 639.

231. ANTI-DSDNA ANTIBODY ISOTYPES IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS: THE NEGLECTED DIAGNOSTIC PARAMETERS / T. Matthias, P. Wusterhausen, P. Gitsioudis, J. Echterhagen // The Journal of Rheumatology. – 2025. – Vol. 52. – ANTI-DSDNA ANTIBODY ISOTYPES IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS. – № Suppl 1. – P. 100.1-100.

232. Reyneveld, G. Ij. Current Understanding of Natural Antibodies and Exploring the Possibilities of Modulation Using Veterinary Models. A Review / G. Ij. Reyneveld, H. F. J. Savelkoul, H. K. Parmentier // Frontiers in Immunology. – 2020. – T. 11. – C. 2139.

233. Exploring Systemic Lupus Erythematosus Pathogenesis through Animal Models: A Systematic Review of Humanized and Pristane-Induced Lupus Mice / D. I. Airlangga, H. R. Rahmawati, H. Susianti, K. Handono // Journal of Biomedicine and Translational Research. – 2023. – T. 9. – Exploring Systemic Lupus Erythematosus Pathogenesis through Animal Models. – № 3. – C. 140-156.

234. Jeltsch-David, H. Neuropsychiatric systemic lupus erythematosus and cognitive dysfunction: The MRL-lpr mouse strain as a model / H. Jeltsch-David, S. Muller // Autoimmunity Reviews. – 2014. – Vol. 13. – Neuropsychiatric systemic lupus erythematosus and cognitive dysfunction. – № 9. – P. 963-973.

235. Gulinello, M. The MRL/lpr Mouse Strain as a Model for Neuropsychiatric Systemic Lupus Erythematosus / M. Gulinello, C. Putterman // Journal of Biomedicine and Biotechnology. – 2011. – Vol. 2011. – P. 1-15.

236. Induction of autoimmunity by pristane and other naturally occurring hydrocarbons / W. H. Reeves, P. Y. Lee, J. S. Weinstein [et al.] // Trends in Immunology. – 2009. – Vol. 30. – № 9. – P. 455-464.

237. Multiplex real-time RT-PCR method for the diagnosis of SARS-CoV-2 by targeting viral N, RdRP and human RP genes / H. Tombuloglu, H. Sabit, H. Al-Khallaf [et al.] // Scientific Reports. – 2022. – Vol. 12. – № 1. – P. 2853.

238. Acute psychological stress increases serum circulating cell-free mitochondrial DNA / C. Trumpff, A. L. Marsland, C. Basualto-Alarcón [et al.] // Psychoneuroendocrinology. – 2019. – Vol. 106. – P. 268-276.

239. Natural Catalytic IgGs Hydrolyzing Histones in Schizophrenia: Are They the Link between Humoral Immunity and Inflammation? / E. A. Ermakov, D. A. Parshukova, G. A. Nevinsky, V. N. Buneva // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Vol. 21. – Natural Catalytic IgGs Hydrolyzing Histones in Schizophrenia. – № 19. – P. 7238.

240. Pristane induced lupus mice as a model for neuropsychiatric lupus (NPSLE) / Y. Yun, X. Wang, J. Xu [et al.] // Behavioral and Brain Functions. – 2023. – Vol. 19. – № 1. – P. 3.

241. Sex- and gender-related differences in systemic lupus erythematosus: a scoping review / K. Albrecht, W. Troll, J. Callhoff [et al.] // Rheumatology International. – 2025. – Vol. 45. – Sex- and gender-related differences in systemic lupus erythematosus. – № 7. – P. 160.

242. Van Vollenhoven, R. F. Sex differences in rheumatoid arthritis: more than meets the eye... / R. F. Van Vollenhoven // BMC Medicine. – 2009. – Vol. 7. – Sex differences in rheumatoid arthritis. – № 1. – P. 12.
243. Four Anti-dsDNA Antibody Assays in Relation to Systemic Lupus Erythematosus Disease Specificity and Activity / H. Enocsson, C. Sjöwall, L. Wirestam [et al.] // The Journal of Rheumatology. – 2015. – Vol. 42. – № 5. – P. 817-825.
244. Álvarez, K. Damage-associated molecular patterns and their role as initiators of inflammatory and auto-immune signals in systemic lupus erythematosus / K. Álvarez, G. Vasquez // International Reviews of Immunology. – 2017. – Vol. 36. – № 5. – P. 259-270.
245. The comings and goings of cell-free DNA: Biological and clinical implications / Y. Malki, Q. Zhou, P. Jiang, Y. M. D. Lo // Med. – 2026. – Vol. 7. – The comings and goings of cell-free DNA. – № 2. – P. 100926.
246. Performance of Spectrophotometric and Fluorometric DNA Quantification Methods / B. Bruijns, T. Hoekema, L. Oomens [et al.] // Analytica. – 2022. – Vol. 3. – № 3. – P. 371-384.
247. Duvvuri, B. Cell-Free DNA as a Biomarker in Autoimmune Rheumatic Diseases / B. Duvvuri, C. Lood // Frontiers in Immunology. – 2019. – T. 10. – C. 502.
248. 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 / S. Zhang, X. Lu, X. Shu [et al.] // Internal Medicine. – 2014. – Vol. 53. – № 24. – P. 2763-2771.
249. Circulating mitochondrial DNA copy numbers represent a sensitive marker for diagnosis and monitoring of disease activity in systemic lupus erythematosus / S. Giaglis, D. Daoudlarian, R. E. Voll [et al.] // RMD Open. – 2021. – Vol. 7. – № 3. – P. e002010.
250. Analysing cell-free plasma DNA and SLE disease activity / J. Atamaniuk, Y. Hsiao, M. Mustak [et al.] // European Journal of Clinical Investigation. – 2011. – Vol. 41. – № 6. – P. 579-583.
251. Raptis, L. Quantitation and characterization of plasma DNA in normals and patients with systemic lupus erythematosus. / L. Raptis, H. A. Menard // Journal of Clinical Investigation. – 1980. – Vol. 66. – № 6. – P. 1391-1399.
252. Enhanced NETosis generation in radiographic axial spondyloarthritis: utility as biomarker for disease activity and anti-TNF- α therapy effectiveness / P. Ruiz-Limon, M. L. Ladehesa-Pineda, M. D. C. Castro-Villegas [et al.] // Journal of Biomedical Science. – 2020. – Vol. 27. – Enhanced NETosis generation in radiographic axial spondyloarthritis. – № 1. – P. 54.
253. Circulating cell-free DNA correlate to disease activity and treatment response of patients with radiographic axial spondyloarthritis / Y. Peng, Y. Wu, S. Chen [et al.] // Scientific Reports. – 2024. – Vol. 14. – № 1. – P. 178.
254. Neutrophil Extracellular Traps–Associated RNA Impedes CD4⁺ Treg Differentiation by TLR7 – IRF7 Axis in Ankylosing Spondylitis / Z. Li, J. Lin, Z. Su [et al.] // Arthritis & Rheumatology. – 2025. – Vol. 77. – Neutrophil Extracellular Traps–Associated circulating cell-free DNA. – № 9. – P. 1242-1253.
255. Circulating tumor necrosis factor- α DNA are elevated in psoriasis / R. Sakamoto, S. Sawamura, I. Kajihara [et al.] // The Journal of Dermatology. – 2020. – Vol. 47. – № 9. – P. 1037-1040.

256. Circulating Cell-Free DNA as Inflammatory Marker in Egyptian Psoriasis Patients / H. A. Anani, A. M. Tawfeik, S. S. Maklad [et al.] // *Psoriasis: Targets and Therapy*. – 2020. – Vol. Volume 10. – P. 13-21.
257. DNA in synovial fluid and the circulation of patients with arthritis / S. A. Leon, M. Revach, G. E. Ehrlich [и др.] // *Arthritis and Rheumatism*. – 1981. – Т. 24. – № 9. – С. 1142-1150.
258. Free DNA in the serum of rheumatoid arthritis patients / S. A. Leon, G. E. Ehrlich, B. Shapiro, V. A. Labbate // *The Journal of Rheumatology*. – 1977. – Т. 4. – № 2. – С. 139-143.
259. Decreased serum cell-free DNA levels in rheumatoid arthritis / M. Dunaeva, B. C. Buddingh', R. E. M. Toes [и др.] // *Auto-Immunity Highlights*. – 2015. – Т. 6. – № 1-2. – С. 23-30.
260. Melamud, M. M. Circulating Cell-Free DNA Levels in Psychiatric Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis / M. M. Melamud, V. N. Buneva, E. A. Ermakov // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24. – Circulating Cell-Free DNA Levels in Psychiatric Diseases. – № 4. – P. 3402.
261. The Role of Plasma Cell-Free Mitochondrial DNA and Nuclear DNA in Systemic Lupus Erythematosus / H.-T. Lee, C.-S. Lin, S.-C. Pan [et al.] // *Frontiers in Bioscience-Landmark*. – 2022. – Vol. 27. – № 12. – P. 333.
262. Circulating Levels of Low-Density Granulocytes and Cell-Free DNA as Predictors of Cardiovascular Disease and Bone Deterioration in SLE Patients / A. Suárez, U. Tobío-Parada, J. Rodríguez-Carrio [et al.] // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2025. – Vol. 125. – № 09. – P. 859-870.
263. Circulating DNA in rheumatoid arthritis: pathological changes and association with clinically used serological markers / E. Rykova, A. Sizikov, D. Roggenbuck [и др.] // *Arthritis Research & Therapy*. – 2017. – Т. 19. – Circulating DNA in rheumatoid arthritis. – № 1. – С. 85.
264. Plasma mtDNA as a possible contributor to and biomarker of inflammation in rheumatoid arthritis / J. Lehmann, S. Giaglis, D. Kyburz [et al.] // *Arthritis Research & Therapy*. – 2024. – Vol. 26. – № 1. – P. 97.
265. Mitochondrial Dysfunction in Rheumatoid Arthritis / C. Ma, J. Wang, F. Hong, S. Yang // *Biomolecules*. – 2022. – Vol. 12. – № 9. – P. 1216.
266. The diverse origins of circulating cell-free DNA in the human body: a critical re-evaluation of the literature / J. Aucamp, A. J. Bronkhorst, C. P. S. Badenhorst, P. J. Pretorius // *Biological Reviews*. – 2018. – Vol. 93. – The diverse origins of circulating cell-free DNA in the human body. – № 3. – P. 1649-1683.
267. Interplay between RAGE and TLR4 Regulates HMGB1-Induced Inflammation by Promoting Cell Surface Expression of RAGE and TLR4 / H. Zhong, X. Li, S. Zhou [et al.] // *The Journal of Immunology*. – 2020. – Vol. 205. – № 3. – P. 767-775.
268. Stripping cell-free DNA from its immune complex is essential for inflammation control using DNase I / S. Chen, Y. Du, C. Zhu [et al.] // *Biomaterials*. – 2026. – Vol. 329. – P. 123992.
269. Expression of High Mobility Group Box Chromosomal Protein 1 and Its Modulating Effects on Downstream Cytokines in Systemic Lupus Erythematosus / J. Li, H. Xie, T. Wen [et al.] // *The Journal of Rheumatology*. – 2010. – Vol. 37. – № 4. – P. 766-775.
270. HMGB1 Promotes Systemic Lupus Erythematosus by Enhancing Macrophage Inflammatory Response / M. Lu, S. Yu, W. Xu [et al.] // *Journal of Immunology Research*. – 2015. – Vol. 2015. – P. 1-12.

271. Roth, S. The role of circulating cell-free DNA as an inflammatory mediator after stroke / S. Roth, S. R. Wernsdorf, A. Liesz // *Seminars in Immunopathology*. – 2023. – Vol. 45. – № 3. – P. 411-425.
272. CitH3, a Druggable Biomarker for Human Diseases Associated with Acute NETosis and Chronic Immune Dysfunction / Y. Chen, Z. A. Tetz, X. Zeng [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2025. – Vol. 17. – № 7. – P. 809.
273. Citrullinated histone H3, a biomarker for neutrophil extracellular trap formation, predicts the risk of mortality in patients with cancer / E. Grilz, L. Mauracher, F. Posch [et al.] // *British Journal of Haematology*. – 2019. – Vol. 186. – № 2. – P. 311-320.
274. Citrullinated histone H3 in systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome (preliminary results) / K. S. Nurbaeva, T. M. Reshetnyak, M. V. Cherkasova, A. M. Lila // *Modern Rheumatology Journal*. – 2023. – Т. 17. – № 4. – С. 19-27.
275. Myeloperoxidase and Other Markers of Neutrophil Activation Associate With Malaria and Malaria/HIV Coinfection in the Human Placenta / D. Sarr, L. J. Oliveira, B. N. Russ [и др.] // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Т. 12. – С. 682668.
276. Increased plasma myeloperoxidase levels in systemic lupus erythematosus / R. W. Telles, G. A. Ferreira, N. P. D. Silva, E. I. Sato // *Rheumatology International*. – 2010. – Vol. 30. – № 6. – P. 779-784.
277. A Retrospective Study on Antinuclear Antibody Patterns in Systemic Lupus Erythematosus Patients and Its Correlation With Serological Markers / A. Ramachandran, K. Kumar, R. Sankaralingam [et al.]. – Text : electronic // *Cureus*. – 2023. – URL: <https://www.cureus.com/articles/192395-a-retrospective-study-on-antinuclear-antibody-patterns-in-systemic-lupus-erythematosus-patients-and-its-correlation-with-serological-markers> (date accessed: 17.03.2026).
278. Long-term prognosis of lupus nephritis: comparison between pediatric, adult, and advanced age onset / M. Calatroni, S. Andrulli, F. Doti [и др.] // *Frontiers in Immunology*. – 2025. – Т. 16. – Long-term prognosis of lupus nephritis. – С. 1531675.
279. Serum Cytokine Levels of Systemic Lupus Erythematosus Patients in the Presence of Concomitant Cardiovascular Diseases / M. M. Melamud, E. A. Ermakov, A. S. Boiko [et al.] // *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*. – 2022. – Vol. 22. – № 8. – P. 852-861.
280. Ling, S. NETosis as a Pathogenic Factor for Heart Failure / S. Ling, J.-W. Xu // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2021. – Vol. 2021. – № 1. – P. 6687096.
281. Neutrophil extracellular traps and cardiovascular disease: Associations and potential therapeutic approaches / Y. Tang, Y. Jiao, X. An [et al.] // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2024. – Vol. 180. – Neutrophil extracellular traps and cardiovascular disease. – P. 117476.
282. The Role of Neutrophil Extracellular Networks in Cardiovascular Pathology / Z. Szymańska, A. Staniewski, M. Karpiński [et al.] // *Cells*. – 2025. – Vol. 14. – № 19. – P. 1562.
283. The Dysregulation of Cytokine Networks in Systemic Lupus Erythematosus / S. A. Apostolidis, L. A. Lieberman, K. Kis-Toth [et al.] // *Journal of Interferon & Cytokine Research*. – 2011. – Vol. 31. – № 10. – P. 769-779.
284. Nolz, J. C. Control of memory CD8+ T cell longevity and effector functions by IL-15 / J. C. Nolz, M. J. Richer // *Molecular Immunology*. – 2020. – Vol. 117. – P. 180-188.

285. Perspective: IL-15 cytokine-armored NK cells as ready-to-use immunotherapy for diverse malignancies: therapeutic potential and toxicity risks / S. L. Baughan, T. Folsom, M. Johnson [и др.] // *Frontiers in Immunology*. – 2025. – Т. 16. – Perspective. – С. 1704404.
286. Genetics of serum concentration of IL-6 and TNF α in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: a candidate gene analysis / J. F. Solus, C. P. Chung, A. Oeser [et al.] // *Clinical Rheumatology*. – 2015. – Vol. 34. – Genetics of serum concentration of IL-6 and TNF α in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. – № 8. – P. 1375-1382.
287. Cytokines in Systemic Lupus Erythematosus—Focus on TNF- α and IL-17 / P. Richter, L. A. Macovei, I. R. Mihai [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24. – № 19. – P. 14413.
288. Jones, B. Pathological Role of Fractalkine/CX3CL1 in Rheumatic Diseases: A Unique Chemokine with Multiple Functions / B. Jones, A. E. Koch, S. Ahmed. – Текст : электронный // *Frontiers in Immunology*. – 2012. – Т. 2. – Pathological Role of Fractalkine/CX3CL1 in Rheumatic Diseases. – URL: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2011.00082/abstract> (дата обращения: 20.03.2026).
289. Potential roles of IL-9 in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus / R.-X. Leng, H.-F. Pan, D.-Q. Ye, Y. Xu // *American Journal of Clinical and Experimental Immunology*. – 2012. – Т. 1. – № 1. – С. 28-32.
290. Increased Serum Interleukin-9 Levels in Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus: Pathogenic Role or Just an Epiphenomenon? / A. T. Dantas, C. D. L. Marques, L. F. Da Rocha Junior [et al.] // *Disease Markers*. – 2015. – Vol. 2015. – Increased Serum Interleukin-9 Levels in Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus. – P. 1-6.
291. INTERLEUKIN-1 RECEPTOR ANTAGONIST: Role in Biology / W. P. Arend, M. Malyak, C. J. Guthridge, C. Gabay // *Annual Review of Immunology*. – 1998. – Vol. 16. – INTERLEUKIN-1 RECEPTOR ANTAGONIST. – № 1. – P. 27-55.
292. IL-1 and IL-1ra are key regulators of the inflammatory response to RNA vaccines / S. Tahtinen, A.-J. Tong, P. Himmels [et al.] // *Nature Immunology*. – 2022. – Vol. 23. – № 4. – P. 532-542.
293. Anti-dsDNA antibodies in the classification criteria of systemic lupus erythematosus / M. Infantino, E. Nagy, N. Bizzaro [et al.] // *Journal of Translational Autoimmunity*. – 2022. – Vol. 5. – P. 100139.
294. Recommendations for the use of anti-dsDNA autoantibodies in the diagnosis and follow-up of systemic lupus erythematosus – A proposal from an expert panel / R. Rojo, J. Calvo Alén, Á. Prada [et al.] // *Autoimmunity Reviews*. – 2023. – Vol. 22. – № 12. – P. 103479.
295. Correlation between Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index, C3, C4 and Anti-dsDNA Antibodies / K. Narayanan, V. Marwaha, K. Shanmuganandan, S. Shankar // *Medical Journal Armed Forces India*. – 2010. – Vol. 66. – № 2. – P. 102-107.
296. IL-4/CCL22/CCR4 Axis Controls Regulatory T-Cell Migration That Suppresses Inflammatory Bone Loss in Murine Experimental Periodontitis / A. C. Araujo-Pires, A. E. Vieira, C. F. Francisconi [et al.] // *Journal of Bone and Mineral Research*. – 2015. – Vol. 30. – № 3. – P. 412-422.
297. Wang, P. Regulatory T cells and B cells: implication on autoimmune diseases / P. Wang, S. G. Zheng // *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. – 2013. – Т. 6. – Regulatory T cells and B cells. – № 12. – С. 2668-2674.

298. B cell-T cell interplay in immune regulation: A focus on follicular regulatory T and regulatory B cell functions / D. Tan, W. Yin, F. Guan [и др.] // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2022. – Т. 10. – B cell-T cell interplay in immune regulation. – С. 991840.
299. Effect of hydroxychloroquine treatment on pro-inflammatory cytokines and disease activity in SLE patients: data from LUMINA (LXXV), a multiethnic US cohort / R. Willis, A. Seif, G. McGwin [et al.] // *Lupus*. – 2012. – Vol. 21. – Effect of hydroxychloroquine treatment on pro-inflammatory cytokines and disease activity in SLE patients. – № 8. – P. 830-835.
300. Endogenous histones function as alarmins in sterile inflammatory liver injury through Toll-like receptor 9 in mice / H. Huang, J. Evankovich, W. Yan [et al.] // *Hepatology*. – 2011. – Vol. 54. – № 3. – P. 999-1008.
301. Marsman, G. Extracellular histones, cell-free DNA, or nucleosomes: differences in immunostimulation / G. Marsman, S. Zeerleder, B. M. Luken // *Cell Death & Disease*. – 2016. – Vol. 7. – Extracellular histones, cell-free DNA, or nucleosomes. – № 12. – P. e2518-e2518.
302. Janeway, C. A. Immunobiology: the immune system in health and disease / C. A. Janeway. – 5. – Garland Publishing, 2001.
303. Невинский, Г. А. Природные каталитические антитела (абзимы) в норме и при патологии / Г. А. Невинский, Т. Г. Канышкова, В. Н. Бунева // *Биохимия*. – 2000. – Т. 65. – № 11. – С. 1473-14876.
304. Nevinsky, G. A. Natural Catalytic Antibodies – Abzymes / G. A. Nevinsky, V. N. Buneva. – Text : electronic // *Catalytic Antibodies* / ed. E. Keinan. – Wiley, 2004. – P. 505-569. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/3527603662.ch19> (date accessed: 24.03.2026).
305. Catalytic Antibodies / ed. E. Keinan. – 1. – Wiley, 2004. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/3527603662> (date accessed: 24.03.2026). – Text : electronic.
306. Nevinsky, G. A. Natural Catalytic Antibodies in Norm, Autoimmune, Viral, and Bacterial Diseases / G. A. Nevinsky, V. N. Buneva // *The Scientific World JOURNAL*. – 2010. – Vol. 10. – P. 1203-1233.
307. Бунева, В. Н. ИСКЛЮЧИТЕЛЬНОЕ МНОГООБРАЗИЕ КАТАЛИТИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ С РАЗЛИЧНЫМИ АКТИВНОСТЯМИ В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С АУТОИММУННЫМИ И ВИРУСНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ, «Молекулярная биология» / В. Н. Бунева, Г. А. Невинский // *Молекулярная биология*. – 2017. – № 6. – С. 969-984.
308. Hydrolysis of Oligodeoxyribonucleotides on the Microarray Surface and in Solution by Catalytic Anti-DNA Antibodies in Systemic Lupus Erythematosus / T. S. Novikova, E. A. Ermakov, E. V. Kostina [et al.] // *Current Issues in Molecular Biology*. – 2023. – Vol. 45. – № 12. – P. 9887-9903.
309. Performance Characteristics of Different Anti-Double-Stranded DNA Antibody Assays in the Monitoring of Systemic Lupus Erythematosus / M. Mahler, C. Bentow, T. O'Malley [et al.] // *Journal of Immunology Research*. – 2017. – Vol. 2017. – P. 1-5.
310. Teodorescu, M. Clinical value of anti-ssDNA (denatured DNA) autoantibody test / M. Teodorescu // *Clinical and Applied Immunology Reviews*. – 2002. – Vol. 2. – № 2. – P. 115-128.
311. Qazi, B. S. Recent Advances in Underlying Pathologies Provide Insight into Interleukin-8 Expression-Mediated Inflammation and Angiogenesis / B. S. Qazi, K. Tang, A. Qazi // *International Journal of Inflammation*. – 2011. – Vol. 2011. – P. 1-13.

312. Bhavsar, I. Macrophage Inflammatory Protein-1 Alpha (MIP-1 alpha)/CCL3: As a Biomarker / I. Bhavsar, C. S. Miller, M. Al-Sabbagh. – Text : electronic // General Methods in Biomarker Research and their Applications : Biomarkers in Disease: Methods, Discoveries and Applications / eds. V. R. Preedy, V. B. Patel. – Dordrecht : Springer Netherlands, 2015. – Macrophage Inflammatory Protein-1 Alpha (MIP-1 alpha)/CCL3. – P. 223-249. – URL: http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-7696-8_27 (date accessed: 08.06.2026).
313. Xu, T. The progression of HMGB1-induced autophagy in cancer biology / T. Xu, L. Jiang, Z. Wang // OncoTargets and Therapy. – 2018. – Vol. Volume 12. – P. 365-377.
314. Polyspecificity of Monoclonal Lupus Autoantibodies Produced by Human-Human Hybridomas / Y. Shoenfeld, J. Rauch, H. Massicotte [et al.] // New England Journal of Medicine. – 1983. – Vol. 308. – № 8. – P. 414-420.
315. Polyreactive autoantibodies in systemic lupus erythematosus have pathogenic potential / J. Zhang, A. M. Jacobi, T. Wang [et al.] // Journal of Autoimmunity. – 2009. – Vol. 33. – № 3-4. – P. 270-274.
316. A subset of lupus anti-DNA antibodies cross-reacts with the NR2 glutamate receptor in systemic lupus erythematosus / L. A. DeGiorgio, K. N. Konstantinov, S. C. Lee [et al.] // Nature Medicine. – 2001. – Vol. 7. – № 11. – P. 1189-1193.
317. Cell-free DNA release following psychosocial and physical stress in women and men / A. S. Limberg, F. Berg, E. Köper [et al.] // Translational Psychiatry. – 2025. – Vol. 15. – № 1. – P. 26.
318. Acute effects of strength exercises and effects of regular strength training on cell free DNA concentrations in blood plasma / S. Tug, A.-K. Tross, P. Hegen [et al.] // PLOS ONE. – 2017. – Vol. 12. – № 9. – P. e0184668.
319. Is there an association between alopecia areata and systemic lupus erythematosus? A population-based study / K. Kridin, G. Shalom, D. Comaneshter, A. D. Cohen // Immunologic Research. – 2020. – Vol. 68. – Is there an association between alopecia areata and systemic lupus erythematosus? – № 1. – P. 1-6.
320. Systemic lupus erythematosus onset in lupus-prone B6.MRL/lpr mice Is influenced by weight gain and Is preceded by an increase in neutrophil oxidative burst activity / J. E. Toller-Kawahisa, N. C. Canicoba, V. P. Venancio [et al.] // Free Radical Biology and Medicine. – 2015. – Vol. 86. – P. 362-373.
321. Obesity and inflammation / J. Karczewski, E. Śledzińska, A. Baturó [и др.] // European Cytokine Network. – 2018. – Т. 29. – № 3. – С. 83-94.
322. Neutrophil extracellular traps (NETs) modulate inflammatory profile in obese humans and mice: adipose tissue role on NETs levels / D. F. Freitas, D. F. Colón, R. L. Silva [et al.] // Molecular Biology Reports. – 2022. – Vol. 49. – Neutrophil extracellular traps (NETs) modulate inflammatory profile in obese humans and mice. – № 4. – P. 3225-3236.
323. The perspectives of NETosis on the progression of obesity and obesity-related diseases: mechanisms and applications / J. Li, L. Yin, S. Chen [и др.] // Frontiers in Cell and Developmental Biology. – 2023. – Т. 11. – The perspectives of NETosis on the progression of obesity and obesity-related diseases. – С. 1221361.
324. Feješ, A. Pathophysiological Role of Neutrophil Extracellular Traps in Diet-Induced Obesity and Metabolic Syndrome in Animal Models / A. Feješ, K. Šebeková, V. Borbélyová // Nutrients. – 2025. – Vol. 17. – № 2. – P. 241.

325. Excess weight and associated risk factors in patients with systemic lupus erythematosus / F. De Miranda Moura Dos Santos, M. C. Borges, R. W. Telles [et al.] // *Rheumatology International*. – 2013. – Vol. 33. – № 3. – P. 681-688.
326. Progranulin mediates the onset of pristane induced systemic lupus erythematosus / M. He, A. Hettinghouse, Y. Bi [et al.] // *Advances in Rheumatology*. – 2024. – Vol. 64. – № 1. – P. 67.
327. CD4+ T Cells Promote IgG Production in MHC-Independent and ICAM-1-Dependent Manners in Pristane-Induced Lupus Mice / S. Liu, Y. Li, J. Li [et al.] // *Mediators of Inflammation*. – 2022. – Vol. 2022. – P. 1-16.
328. Steward, M. W. Changes in immunoglobulin class and subclass of anti-DNA antibodies with increasing age in N/ZBW F1 hybrid mice / M. W. Steward, F. C. Hay // *Clinical and Experimental Immunology*. – 1976. – T. 26. – № 2. – C. 363-370.
329. Ipr gene control of the anti-DNA antibody response / D. S. Pisetsky, S. A. Caster, J. B. Roths, E. D. Murphy // *Journal of Immunology*. – 1982. – T. 128. – № 5. – C. 2322-2325.
330. Howard, W. A. Antibody Quality in Old Age / W. A. Howard, K. L. Gibson, D. K. Dunn-Walters // *Rejuvenation Research*. – 2006. – Vol. 9. – № 1. – P. 117-125.
331. High prevalence of anti-cardiolipin and other autoantibodies in a healthy elderly population / M. N. Manoussakis, A. G. Tzioufas, M. P. Silis [и др.] // *Clinical and Experimental Immunology*. – 1987. – T. 69. – № 3. – C. 557-565.
332. Immunization of mice with P6 of nontypeable *Haemophilus influenzae*: kinetics of the antibody response and IgG subclasses / W. H. Badr, D. Loghmanee, R. J. Karalus [et al.] // *Vaccine*. – 1999. – Vol. 18. – Immunization of mice with P6 of nontypeable *Haemophilus influenzae*. – № 1-2. – P. 29-37.
333. Chronological evolution of IgM, IgA, IgG and neutralisation antibodies after infection with SARS-associated coronavirus / P.-R. Hsueh, L.-M. Huang, P.-J. Chen [et al.] // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2004. – Vol. 10. – № 12. – P. 1062-1066.

7. ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица П1. Список цитокинов, для которых была измерена концентрация в рамках исследования.

Аббревиатура	Описание	Семейство
EGF	Эпидермальный фактор роста	Факторы роста
Эотаксин / CCL11	Хемокин с мотивом C-C, лиганд 11; эозинофильный хемотаксический белок	Хемокины
FGF2	Фактор роста фибробластов 2; Основной белок роста фибробластов	Факторы роста
Flt-3L	Fms-подобный лиганд тирозинкиназы 3	Факторы роста
Фракталкин / CX3CL1	Хемокин с мотивом C-X3-C, лиганд 1	Хемокины
G-CSF	Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор	Факторы роста
GM-CSF	Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор	Факторы роста
GRO / CXCL1	Альфа протеин регулирующий рост; хемокин с мотивом C-X-C, лиганд 1	Хемокины
IFN α 2	Интерферон альфа 2	Интерфероны
IFN γ	Интерферон гамма	Интерфероны
IL-1 α	Интерлейкин 1 альфа	Интерлейкины
IL-1 β	Интерлейкин 1 бета	Интерлейкины
IL-1RA	Антагонист рецептора интерлейкина 1	Интерлейкины
IL-2	Интерлейкин 2	Интерлейкины
IL-3	Интерлейкин 3	Интерлейкины
IL-4	Интерлейкин 4	Интерлейкины
IL-5	Интерлейкин 5	Интерлейкины
IL-6	Интерлейкин 6	Интерлейкины
IL-7	Интерлейкин 7	Интерлейкины
IL-8 / CXCL8	Интерлейкин 8; Хемокин с мотивом C-X-C, лиганд 8	Интерлейкины / хемокины
IL-9	Интерлейкин 9	Интерлейкины
IL-10	Интерлейкин 10	Интерлейкины
IL-12P40	Субъединица бета интерлейкина 12; стимулирующий фактор 2 естественных киллеров; фактор p40 созревания цитотоксических лимфоцитов; субъединица p40 интерлейкина 12	Интерлейкины
IL-12P70	Интерлейкин 12, состоящий из двух ковалентно связанных субъединиц: p40 и p35	Интерлейкины

IL-13	Интерлейкин 13	Интерлейкины
IL-15	Интерлейкин 15	Интерлейкины
IL-17A	Интерлейкин 17A	Интерлейкины
IP10 / CXCL10	Интерферон гамма индуцированный протеин; хемокин с мотивом C-X-C-L, лиганд 10	Хемокины
MCP-1 / CCL2	Протеин хемотаксиса моноцитов 1; хемокин с мотивом C-C-L, лиганд 2	Хемокины
MCP-3 / CCL7	Протеин хемотаксиса моноцитов 3; хемокин с мотивом C-C-L, лиганд 7	Хемокины
MDC / CCL22	Макрофагальный хемокин; хемокин с мотивом C-C-L, лиганд 22	Хемокины
MIP-1 α / CCL3	Воспалительный протеин макрофагов 1 альфа; хемокин с мотивом C-C-L, лиганд 3	Хемокины
MIP-1 β / CCL4	Воспалительный протеин макрофагов 1 бета; хемокин с мотивом C-C-L, лиганд 4	Хемокины
PDGF-AA	Тромбоцитарный фактор роста AA	Факторы роста
PDGF-AA/AB	Тромбоцитарный фактор роста AA/AB	Факторы роста
RANTES / CCL5	Регулируемый при активации, нормально экспрессируемый и секретируемый Т-клетками; хемокин с мотивом C-C-L, лиганд 5	Хемокины
sCD40L	Растворимый лиганд CD40; лиганд суперсемейства фактора некроза опухоли, член 5	Суперсемейство фактора некроза опухоли
TGF- α	Трансформирующий фактор роста альфа	Факторы роста
TNF α	Фактор некроза опухоли альфа	Суперсемейство фактора некроза опухоли
TNF β	Фактор некроза опухоли бета	Суперсемейство фактора некроза опухоли
VEGF	Сосудистый эндотелиальный фактор роста	Факторы роста