

ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ДНК В ПЛАЗМЕ КРОВИ И АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

Гаврилова Е.Д., Демченко Е.Н., Гойман Е.В., Чумасова О.А.,
Вольский Н.Н., Сизиков А.Э., Козлов В.А.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,
г. Новосибирск, Россия

Резюме. Нейтрофильные лейкоциты играют ключевую роль в поражении суставов при развитии ревматоидного артрита (РА). Процесс специфической гибели этих клеток (нетоз) может быть важным источником происхождения обнаруживаемого в крови пациентов с РА повышенного уровня внДНК. Большой интерес представляет изучение предполагаемой зависимости между содержанием в крови внДНК, способной играть роль аутоантигена и таким образом участвовать в инициации аутоиммунных реакций и показателями активации нейтрофилов при этом иммунопатологическом состоянии. Целью исследования стало определение уровней внДНК в плазме крови пациентов с РА в зависимости от клинических показателей течения заболевания и выявление возможной связи данного показателя с активацией нейтрофильных лейкоцитов. В исследование были включены 63 пациента с РА, находившиеся на стационарном лечении в ревматологическом отделении клиники иммунопатологии НИИФКИ (г. Новосибирск) и 28 условно здоровых доноров. Определение уровня внДНК проводили с помощью флуоресцентного красителя PicoGreen. Нейтрофилы из периферической крови доноров и пациентов с ревматоидным артритом выделяли в двойном градиенте плотности фиколл-урографин. Нейтрофильные лейкоциты составляли более 98% во фракции выделенных клеток, а их жизнеспособность составляла 99%. Часть свежее выделенных нейтрофилов стимулировали добавлением форболмиристан-ацетата (РМА). Концентрацию миелопероксидазы в плазме крови доноров и пациентов с РА определяли с помощью набора Human MPO ELISA kit. Показано, что возрастание концентрации внеклеточной ДНК в плазме крови пациентов с РА происходит параллельно увеличению степени активности заболевания, и данный параметр может служить относительно независимым показателем интенсивности патологического процесса. Выявлены статистически достоверные корреляции уровня внДНК с основными показателями, позволяющими оценивать активность заболевания в клинике: DAS-28 и уровнем С-реактивного белка в сыворотке ($p < 0,05$). У пациентов с ревматоидным артритом на фоне лечения наблюдается снижение концентрации внДНК в плазме, что может быть связано с положительным прогнозом: снижением клинических проявлений заболевания, а значит, и правильно подобранной терапией. Установлена корреляция между уровнем внДНК и концентрацией миелопероксидазы в крови пациентов с РА. Полученные при исследовании данные говорят о возможной

Адрес для переписки:

Гаврилова Елена Давидовна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск,
ул. Ядринцевская, 14, каб. 215.
Тел.: 8 (383) 222-04-38.
Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: edav.gavr@mail.ru

Address for correspondence:

Gavrilova Elena D.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrinsevskaya str., 14, room 215.
Phone: 7 (383) 222-04-38.
Fax: 7 (383) 222-70-28.
E-mail: edav.gavr@mail.ru

Образец цитирования:

Е.Д. Гаврилова, Е.Н. Демченко, Е.В. Гойман,
О.А. Чумасова, Н.Н. Вольский, А.Э. Сизиков,
В.А. Козлов «Внеклеточная ДНК в плазме крови
и активность нейтрофильных лейкоцитов у
пациентов с ревматоидным артритом» // Российский
иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 2. С. 147-154.
doi: 10.46235/1028-7221-1110-PED
© Гаврилова Е.Д. и соавт., 2022

For citation:

E.D. Gavrilova, E.N. Demchenko, E.V. Goiman,
O.A. Chumasova, N.N. Volsky, A.E. Sizikov, V.A. Kozlov
“Plasma extracellular DNA and neutrophilic leukocyte
activity in patients with rheumatoid arthritis”, Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2022,
Vol. 25, no. 2, pp. 147-154.
doi: 10.46235/1028-7221-1110-PED
DOI: 10.46235/1028-7221-1110-PED

связи повышенной концентрации внеклеточной ДНК с активацией нейтрофильных лейкоцитов при ревматоидном артрите и с усилением нетоза в пораженных суставах.

Ключевые слова: внеклеточная ДНК, нейтрофильные лейкоциты, нетоз, миелопероксидаза

PLASMA EXTRACELLULAR DNA AND NEUTROPHILIC LEUKOCYTE ACTIVITY IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

Gavrilova E.D., Demchenko E.N., Goiman E.V., Chumasova O.A., Volsky N.N., Sizikov A.E., Kozlov V.A.

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. Neutrophilic leukocytes play a key role for the joint damage in development of rheumatoid arthritis (RA). The specific death mode of these cells (netosis) may be an important reason of increase of cell-free DNA (cfDNA) in peripheral blood of the RA patients. Of great interest would be studies of alleged relationships between the of blood cfDNA contents being able of playing the role of an auto-antigen participating in the initiation of autoimmune reactions, and indices of neutrophil activation in this immunopathological disorder. The aim of the present study was to determine the levels of cfDNA in blood plasma of patients with RA depending on the clinical course of the disease, and to evaluate possible relationships between this index and activation of neutrophilic leukocytes. The study was conducted on 28 conditionally healthy donors and 63 patients with RA from the Rheumatology Department at the Clinic of Immunopathology (Novosibirsk). The level of cfDNA was determined using PicoGreen fluorescent dye. Neutrophils from the peripheral blood of donors and patients with rheumatoid arthritis were isolated in a Ficoll-Urografin density gradient. Neutrophilic leukocytes accounted for more than 98% of the fraction of isolated cells, and their viability was 99%. A portion of freshly isolated neutrophils was stimulated by phorbol myristate acetate. Concentration of myeloperoxidase in blood plasma of donors and patients with RA was determined using the Human MPO ELISA kit. It has been shown that the increased concentration of extracellular DNA in blood plasma of RA patients correlates with an higher degree of disease activity, and this parameter may serve as a relatively independent indicator of the disease intensity. A correlation was found between the level of cfDNA and common biochemical markers used to assess the activity of disease, i.e., DAS-28 and C-reactive protein levels in serum ($p < 0.05$). Decrease of cfDNA concentrations is detected during treatment of the RA patients. This is due to the expected prognosis, i.e., a decreased manifestation of the disease, which also means correct administration of therapy. A relationship was found between the level of cfDNA and blood myeloperoxidase concentration in RA patients. The data obtained during the study suggest a possible connection between increased concentration of extracellular DNA, and activation of neutrophilic leukocytes in rheumatoid arthritis, with increased netosis in the affected joints.

Keywords: extracellular DNA, neutrophilic leukocytes, netosis, myeloperoxidase

Исследование выполнено за счет средств федерального бюджета для выполнения государственного задания на научно-исследовательскую работу «Изучение иммунопатогенеза фенотипов социально значимых заболеваний человека и полиморбидности как основа для разработки новых методов персонифицированной диагностики и лечения» (РК № 122012000366-9).

Введение

В последние десятилетия было установлено, что содержание внеклеточной ДНК (внДНК) в циркулирующей крови человека и животных за-

кономерно изменяется при различных патофизиологических процессах и может служить показателем их динамики. Существенные изменения этого параметра обнаружены у пациентов с различными видами опухолей, при воспалительных реакциях, иммунопатологических состояниях и других заболеваниях (в качестве обзора см. работы [1, 7]). Поскольку предполагается, что внДНК способна играть роль аутоантигена и участвовать в инициации аутоиммунных реакций, внимание исследователей было привлечено к изменениям ее концентрации в крови при болезнях, обусловленных нарушениями деятельности иммунной

системы и, в частности, при ревматоидном артрите (РА). Было показано, что уровень внДНК в плазме крови при РА существенно повышен и в некоторых случаях может быть связан с особенностями патологического процесса у индивидуальных больных [7, 8, 11].

Нейтрофильные лейкоциты играют ключевую роль в поражении суставов при развитии РА и нетоз этих клеток (то есть выход фрагментов ядерного материала в комплексе с разнообразными гидролитическими ферментами за пределы цитоплазматической мембраны и формирование специфической внеклеточно расположенной «сети») может быть важным источником происхождения внДНК, обнаруживаемой в крови пациентов с РА.

В связи с этим **целью настоящей работы** стало изучение зависимости уровня внДНК в плазме крови пациентов с РА от клинических показателей течения болезни и выявление возможной связи между активацией нейтрофильных лейкоцитов и уровнем внДНК.

Материалы и методы

Характеристика пациентов

В данную работу были включены 63 пациента с РА, находившиеся на стационарном лечении в ревматологическом отделении клиники иммунопатологии НИИФКИ (г. Новосибирск). Право на участие в исследовании подтверждалось письменным информированным согласием. Протокол обследования был одобрен локальным этическим комитетом.

Исследованная группа состояла из 54 женщин (85%) и 9 мужчин (15%) в возрасте от 22 до 83 лет (медиана – 55 лет). По степени активности заболевания исследуемые были разделены на три группы: 1 – с низкой активностью ($DAS-28 < 3,2$), 2 – с умеренной ($DAS-28$ – от 3,2 до 5,1) и 3 – с высокой активностью ($DAS-28 > 5,1$). В клинике иммунопатологии НИИФКИ у всех исследуемых было определено наличие ревматоидного фактора, антител к циклическому цитруллинсодержащему пептиду и уровень С-реактивного белка в сыворотке крови, что учитывалось при постановке диагноза РА и использовано в данном исследовании.

В исследование включены 28 образцов от условно здоровых доноров, набранных на Пункте забора донорской крови ГКБ № 1 г. Новосибирска.

Методы исследования

Выделение внеклеточной ДНК

Забор периферической крови для проведения анализа осуществлялся с помощью венозной пункции в вакуумную пробирку с антикоагулянтом (ЭДТА).

Плазму отделяли от форменных элементов центрифугированием при 400g в течение 20 мин [12]. Выделение внеклеточной ДНК из плазмы проводили на колонках компании «Био-Силика» (г. Новосибирск) согласно инструкции по применению «Набора для выделения ДНК из плазмы крови». Определение ДНК проводили с помощью флюоресцентного красителя PicoGreen (Invitrogen). Концентрация ДНК пересчитывалась по калибровочной кривой, построенной для известных концентраций стандартной двуцепочечной λ ДНК.

Уровень метилирования ДНК был определен с помощью набора реагентов Methyl Flash Methylated DNA Quantification Kit (Colorimetric) (Epigentek, США) согласно протоколу производителя. В основе метода лежит колориметрическое иммуноферментное определение процентного содержания 5-метилцитозина в образце ДНК. Оптическая плотность образцов измерялась на спектрофотометре Model 680 Microplate Reader (Bio-Rad, США) при длине волны 450 нм.

Выделение нейтрофилов

Периферическую кровь у доноров и пациентов с ревматоидным артритом забирали в утренние часы натощак в пропиленовые пробирки с гепарином (20 МЕ/мл крови). Нейтрофилы выделяли с помощью центрифугирования в двойном градиенте плотности фиколл-урографин ($\rho = 1,077$ г/см³ и $\rho = 1,119$ г/см³) при 400 g 25 мин. Полученное кольцо нейтрофилов переносили в пробирки и трижды отмывали в 5 мл PBS, центрифугируя при 200 g 10 минут, а затем ресуспендировали в культуральной среде, включающей RPMI-1640 без фенолового красного с добавлением 1% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки. Нейтрофильные лейкоциты составляли более 98% во фракции выделенных клеток, а их жизнеспособность составляла 99%, что определялось тестом с трипановым синим.

Определение спонтанного и стимулированного нетоза нейтрофилов *in vitro*

Свежевыделенные нейтрофилы переносили в черный планшет в концентрации 2×10^5 клеток на лунку и часть из них стимулировали добавлением форболмиристан-ацетата (Sigma Aldrich, Франция) до концентрации 50 nM, с последующим культивированием при 37 °C в атмосфере 5% CO₂ в течение 3 часов. Затем в лунки вносили 5 μ M Sytox Green (Invitrogen, США). Уровень флюоресценции регистрировали на ридере Tristar™ LB941 BERTHOLD (Германия): длина волны возбуждения – 485 нм и длина волны излучения – 527 нм [3].

Определение миелопероксидазы

Концентрацию миелопероксидазы в плазме крови больных определяли иммуноферментным

методом с помощью набора Human MPO ELISA kit (НускультБиотек, Нидерланды).

Ревматоидный фактор (суммарное определение субклассов IgA-, IgM- и IgG-аутоантител) определяли в лаборатории клинической иммунологии клиники иммунопатологии НИИФКИ на анализаторе специфических белков Immage 800 (Beckman Coulter).

Статистическая обработка

Результаты в таблице и на рисунке приведены в виде средних величин. Достоверность выявленных различий и величину связей между измеренными параметрами оценивали методами непараметрической статистики с использованием U-критерия Манна–Уитни, T-критерия Вилкоксона и коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

Результаты и обсуждение

Данные, полученные при проведении данного исследования, убедительно свидетельствуют о значительном увеличении содержания свободной внеклеточной ДНК в плазме крови пациентов с РА и о тесной связи этого параметра с активностью заболевания.

На рисунке 1 видно, что среднее содержание вДНК у пациентов, поступивших в клинику с диагнозом РА и рассматриваемых как единая группа, в несколько раз превосходит величину этого показателя в группе здоровых доноров (рис. 1А). Также показано, что такое увеличение количества вДНК в плазме крови прямо связано со степенью активности патологического процесса у конкретных пациентов (рис. 1Б).

При этом в группе с наименьшей активностью заболевания (группа 1; среднее значение DAS-28 – 2,80) уровень вДНК был практически вдвое ниже, чем ее уровни в группах 2 (DAS-28 – 4,11) и 3 (DAS-28 – 5,85). О значимой положительной связи концентрации вДНК в плазме крови пациентов с РА со степенью активности патологического процесса, наблюдаемого у них в период исследования, говорят и статистически достоверные корреляции уровня вДНК с основными показателями, позволяющими оценивать активность заболевания в клинике: DAS-28 ($\rho = 0,319$; $p < 0,05$) и уровнем С-реактивного белка в сыворотке ($\rho = 0,270$; $p < 0,05$). Полученные результаты хорошо согласуются с данными, опубликованными другими авторами [7, 8, 11], о повышении

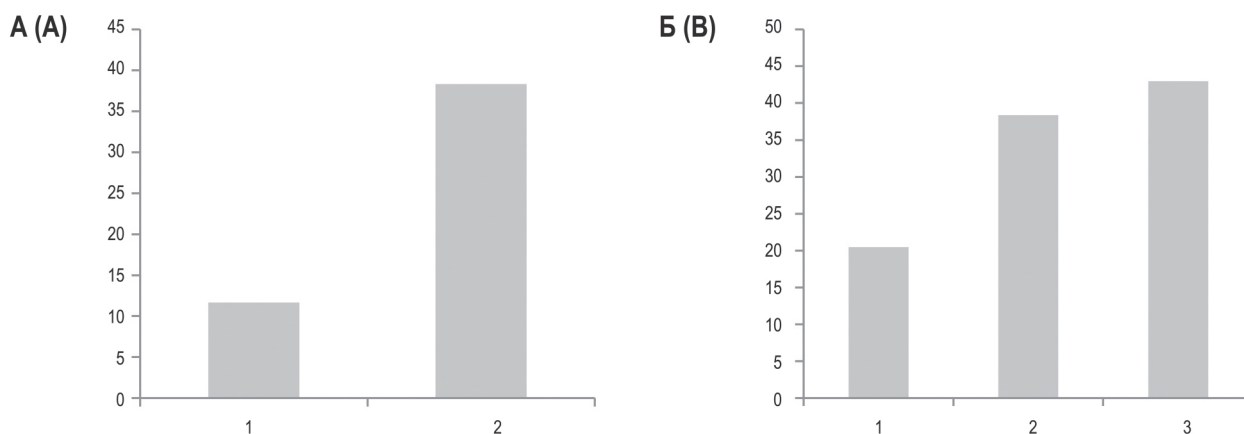


Рисунок 1. Концентрация вДНК в плазме крови условно здоровых доноров и пациентов с ревматоидным артритом

Примечание. По оси ординат – уровень внеклеточной ДНК, нг/мл. По оси абсцисс – группы:

А: 1 – условно здоровые доноры (n = 18); 2 – группа пациентов с РА (n = 58).

Б – уровни вДНК у пациентов с РА в зависимости от степени активности патологического процесса: 1 – группа пациентов с низкой активностью (n = 9); 2 – с умеренной активностью (n = 26); 3 – с высокой активностью заболевания (n = 23).

*** – достоверное отличие от доноров ($p < 0,001$).

Figure 1. Concentration of cfDNA in the blood plasma of conditionally healthy donors and patients with rheumatoid arthritis

Note. The y-axis shows the level of extracellular DNA, ng/mL. On the abscissa axis – groups:

(A) 1, conditionally healthy donors (n = 18); 2, group of patients with RA (n = 58).

(B) levels of cfDNA in patients with RA depending on the degree of activity of the pathological process: 1, group of patients with low activity (n = 9); 2, with moderate activity (n = 26); 3, with high disease activity (n = 23).

***, significant difference from donors ($p < 0.001$).

уровня внДНК при РА и о связи этого показателя с клиническим течением болезни.

У части исследованных пациентов (24 человека) уровень внДНК был определен дважды: при поступлении в клинику и после курса назначенного лечения (как правило, введение ритуксимаба или тоцилизумаба, стероидных гормонов и вазоактивная терапия). Полученные при этом данные также свидетельствуют о существовании закономерной связи исследуемого параметра с клинической картиной заболевания. Исходно повышенный уровень внДНК в этой группе пациентов существенно снизился с 52,92 нг/мл до 36,56 нг/мл ($p < 0,05$) после курса специфической терапии. При этом наблюдалось и параллельное уменьшение степени активности патологического процесса, оцениваемой по величине DAS-28: после лечения этот показатель снизился с 4,44 до 4,01 ($p < 0,01$).

Немаловажное значение в нарастании количества внДНК при развитии заболевания может иметь обнаруженное у пациентов с РА увеличение доли ДНК митохондриального происхождения в общем пуле внДНК [11]. Будучи сходной с бактериальной ДНК, в частности по значительно более низкому, чем в ядерной ДНК уровню метилирования нуклеотидов [7, 10], эта фракция нуклеиновых кислот способна – через рецептор TLR9 – стимулировать интенсивность воспалительных реакций [13, 14]. Следовало ожидать, что развитие РА, будет сопровождаться снижением степени метилирования общего пула внДНК. Действительно, метилирование внДНК в исследу-

дованной группе пациентов с РА (17,5%) оказалось несколько ниже, чем у здоровых доноров (20,8%). После проведенного курса соответствующей терапии отмечена тенденция к повышению процентного содержания 5-метилцитозина в образцах ДНК у пациентов (21,7%). Увеличение выборки исследованных пациентов, возможно, позволит достоверно подтвердить наличие нарушения эпигенетических механизмов, наблюдаемых при аутоиммунных заболеваниях, в частности при РА.

Существенным результатом проведенного исследования можно считать выявление связи между уровнем внДНК и концентрацией миелопероксидазы в крови пациентов с РА. У исследованных пациентов с РА среднее содержание этого характерного для нейтрофильных лейкоцитов фермента составляло 22,8 нг/мл, что значимо превышало величину данного показателя у здоровых доноров – 9,7 нг/мл ($p < 0,05$). При этом возрастание концентрации миелопероксидазы в крови пациентов с РА обнаруживалось параллельно увеличению у них уровня внДНК, и коэффициент ранговой корреляции (ρ) между этими параметрами был равен 0,412 ($p < 0,05$). Поскольку наличие миелопероксидазы – специфический признак нейтрофилов, ее появление в крови расценивается обычно как показатель активации и нетоза с выходом цитоплазматических белков во внеклеточную среду [5]. Таким образом, исходя из полученных нами данных, можно предполагать, что увеличение концентрации внДНК у пациентов с РА в значительной степени обусловлено

ТАБЛИЦА 1. ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ИНТЕНСИВНОСТЬ НЕТОЗА ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ (РА) И УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ

TABLE 1. FLUORESCENT INTENSITY OF NETOSIS IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS (RA) AND HEALTHY DONORS

Параметры Parameters	Здоровые доноры Healthy donors	Пациенты с РА Patients with RA	p-значения p-value
Нетоз спонтанный Spontaneous netosis	1344549	1388928	$p < 0,05$
Нетоз при стимуляции Netosis on stimulation	1825981	2633243	$p < 0,001$
Индекс стимуляции Stimulation Index	1,30	2,06	$p < 0,001$

Примечание. Интенсивность нетоза представлена в условных единицах (интенсивность флуоресценции красителя) и отражает относительное количество ДНК нейтрофильных лейкоцитов, перешедшее в раствор после трехчасовой инкубации *in vitro*.

Note. The intensity of netosis is presented in conventional units (dye fluorescence intensity) and reflect the relative amount of neutrophils DNA that passed into solution after a three-hour incubation *in vitro*.

нетозом нейтрофилов и появлением их ДНК во внеклеточном пространстве, а следовательно, изменения этого параметра могут рассматриваться и в качестве косвенного признака вовлеченности нейтрофильных лейкоцитов в иммунопатологический процесс. В пользу такого предположения свидетельствуют и данные Birkelund и соавт. [4], убедительно обосновывающие нейтрофильное происхождение внДНК в синовиальной жидкости пораженных суставов у пациентов с РА.

Одной из задач данной работы было определение функционального состояния нейтрофильных лейкоцитов из крови больных РА и их готовность к реакции нетоза с появлением нитей ДНК во внеклеточном пространстве, так называемой, нейтрофильной ДНК (внДНКн). Результаты этого исследования приведены в таблице 1.

Видно, что интенсивность спонтанного (без каких-либо внешних воздействий) нетоза нейтрофилов, выделенных из крови пациентов с РА, лишь не намного (но статистически достоверно) превышает аналогичный показатель у здоровых лиц. В то же время на стимуляцию клеток РМА нейтрофилы пациентов с РА отвечают значительно более выраженной реакцией, нежели лейкоциты доноров, что отчетливо видно при сравнении индексов стимуляции в этих группах испытуемых. Можно считать, что нейтрофильные лейкоциты пациентов с РА находятся в примированном состоянии, потенцирующем ответ этих клеток на сигналы, вызывающие запуск реакции нетоза. Такое утверждение об особом активированном состоянии нейтрофилов при РА не вызывает удивления, поскольку издавна полиморфноядерные нейтрофильные лейкоциты считаются клетками, играющими ключевые роли в развитии воспалительного поражения суставов при этом заболевании. В литературе достаточно работ, в которых описана активация лейкоцитов у пациентов с РА, приводящая к усилению их нетоза в условиях *in vitro* [6, 9].

Следует обратить внимание на то обстоятельство, что у исследованных пациентов не было обнаружено какой-либо значимой корреляции между показателями спонтанного и стимулированного нетоза *in vitro*, с одной стороны, и концентрацией внДНК в крови, с другой. На первый взгляд, этот результат ставит под сомнение ранее высказанное утверждение о существенной роли нетоза нейтрофилов в резком увеличении уровня внДНК у таких пациентов. Видимую противоречивость полученных результатов нетрудно объяснить, если принять во внимание тот факт, что выявленная примированность нейтрофилов из периферической крови представляет собой системный показатель и отражает общее состояние нейтрофильных лейкоцитов при данной пато-

логии, в то время как на уровень внДНК может влиять лишь интенсивность нетоза в конкретных участках воспаления пораженных суставов. В тех же случаях, когда уровень внДНК и интенсивность нетоза определялись непосредственно на месте (в синовиальной жидкости воспаленных суставов) тесная корреляция между этими параметрами выявлялась вполне отчетливо [4].

В относительно недавней работе Aleyd и соавт. [2] было показано, что субкласс IgA-аутоантител, входящий в состав ревматоидного фактора (РФ), способен фиксироваться на поверхности нейтрофильных лейкоцитов, вызывая их нетоз и, соответственно, выход ДНК за пределы клеточной мембраны. Исходя из этого, можно было бы ожидать, что у больных РА должна выявляться некоторая связь между содержанием РФ в крови и показателями активации нейтрофилов. В проведенном нами исследовании корреляция между общим ревматоидным фактором в сыворотке крови больных и спонтанным нетозом их нейтрофилов *in vitro* оказалась незначительна ($\rho = 0,217$; $p > 0,05$). При дополнительном сравнении интенсивности нетоза *in vitro* в группах пациентов с низким (< 20 МЕ) и высоким (> 20 МЕ) содержанием РФ в крови обнаружено, что при высоком уровне РФ нетоз оказался более интенсивным нежели в оппозитной группе больных (1494256 vs 1206158), но это различие не достигало уровня статистической достоверности ($p = 0,09$). Однако полученные результаты нельзя считать противоречащим факту, установленному в работе Aleyd и соавт. Расхождения легко объяснимы тем, что функционально активный субкласс IgA-аутоантител, составляет лишь часть в общей величине РФ, и, вероятно, вследствие этого, в нашем исследовании связь между общим уровнем РФ, суммарным определением субклассов IgA-, IgM- и IgG-аутоантител, и нетозом нейтрофилов оказывается размытой.

Заключение

Согласно полученным в настоящем исследовании данным, уровень внДНК в плазме крови больных РА способен служить относительно независимым показателем степени активности патологического процесса при этом заболевании. В связи с этим можно говорить о перспективности анализа данного параметра в качестве дополнительного критерия оценки при комплексной диагностики патогенеза РА и эффективности подбора проводимой терапии. В то же время зависимость внДНК от степени активации и интенсивности нетоза нейтрофильных лейкоцитов еще не до конца выяснена и требует дальнейшего изучения.

Список литературы / References

1. Козлов В.А. Свободная внеклеточная ДНК в норме и при патологии // Медицинская иммунология, 2013. Т. 15, № 5. С. 399-412. [Kozlov V.A. Free extracellular DNA in normal state and under pathological conditions. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2013, Vol. 15, no. 5, pp. 399-412. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2013-5-399-412.
2. Aleyd E., Al M., Tuk C.W., van der Laken C.J., van Egmond M. IgA complexes in plasma and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis induce neutrophil extracellular traps via FcαR1RA. *J. Immunol.*, 2016, Vol. 197, no. 12, pp. 4552-4559.
3. Barrientos L., Marin-Esteban V., Chaisemartin L., Lievin Le-Moal V., Sandre C., Bianchini E., Nicolas V., Pallardy M., Chollet-Martin S. An improved strategy to recover large fragments of functional human neutrophil extracellular traps. *Front. Immunol.*, 2013, Vol. 4, 166. doi: 10.3389/fimmu.2013.00166.
4. Birkelund S., Bennike T.B., Kastaniegaard K., Lausen M., Poulsen T.B.G., Kragstrup T.W., Deleuran B.W., Christiansen G., Stensballe A. Proteomic analysis of synovial fluid from rheumatic arthritis and spondyloarthritis patients. *Clin. Proteom.*, 2020, Vol. 17, 29. doi: 10.1186/s12014-020-09292-9.
5. Chornenki N.L.J., Coke R., Kwong A.C., Dwivedi D.J., Xu M.K., McDonald E., Marshall J.C., Fox-Robichaud A.E., Charbonney E., Liaw P.C. Comparison of the source and prognostic utility of cfDNA in trauma and sepsis. *Intensive Care Med. Exp.*, 2019, Vol. 7, no. 1, pp. 29-38.
6. Chowdhury C.S., Giaglis S., Walker U.A., Buser A., Hahn S., Hasler P. Enhanced neutrophil extracellular trap generation in rheumatoid arthritis: analysis of underlying signal transduction pathways and potential diagnostic utility. *Arthritis Res. Ther.*, 2014, Vol. 16, no. 3, R122. doi: 10.1186/ar4579.
7. Duvvuri B., Lood C. Cell-free DNA as a biomarker in autoimmune rheumatic diseases. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 502. doi: 10.3389/fimmu.2019.00502.
8. Hashimoto T., Yoshida K., Hashiramoto A., Matsui K. Cell-free DNA in rheumatoid arthritis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 16, 8941. doi: 10.3390/ijms22168941.
9. Perez-Sanchez C., Ruiz-Limon P., Aguirre M.A., Jimenez-Gomez Y., Arias-de la Rosa I., Abalos-Aguilera M.C., Rodriguez-Ariza A., Castro-Villegas M.C., Ortega-Castro R., Segui P., Martinez C., Gonzalez-Conejero R., Rodriguez-Lopez S., Gonzalez-Reyes J.A., Villalba J.M., Collantes-Estevez E., Escudero A., Barbarroja N., Lopez-Pedraza Ch. Diagnostic potential of NETosis-derived products for disease activity, atherosclerosis and therapeutic effectiveness in Rheumatoid Arthritis patients. *J. Autoimmun.*, 2017, Vol. 82, no. 1, pp. 31-40.
10. Pollack Y., Kasir J., Shemer R., Metzger S., Szyf M. Methylation pattern of mouse mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res.*, 1984, Vol. 12, no. 12, pp. 4811-4824.
11. Rykova E., Sizikov A., Roggenbuck D., Antonenko O., Bryzgalov L., Morozkin E., Skortsova K., Vlassov V., Laktionov P., Kozlov V. Circulating DNA in rheumatoid arthritis: pathological changes and association with clinically used serological markers. *Arthritis Res. Ther.*, 2017, Vol. 19, no. 1, pp. 85-94.
12. Tamkovich S.N., Litviakov N.V., Bryzgunova O.E., Dobrodeev A.Y., Rykova E.Y., Tuzikov S.A., Zav'ialov A.A., Vlassov V.V., Cherdyn'tseva N.V., Laktionov P.P. Cell-surface-bound circulating DNA as a prognostic factor in lung cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2008, Vol. 1137, no. 1, pp. 214-217.
13. West A.P., Shadel G.S. Mitochondrial DNA in innate immune responses and inflammatory pathology. *Nat. Rev. Immunol.*, 2017, Vol. 17, no. 6, pp. 363-375.
14. Zhang Q., Raoof M., Chen Y., Sumi Y., Sursal T., Junger W., Brohi K., Itagaki K., Hauser C.J. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature*, 2010, Vol. 464, no. 7285, pp. 104-107.

Авторы:

Гаврилова Е.Д. — к.б.н., заведующая лабораторией экспериментальной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Демченко Е.Н. — к.х.н., научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Гойман Е.В. — к.м.н., научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Gavrilova E.D., PhD (Biology), Head, Laboratory of Experimental Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Demchenko E.N., PhD (Chemistry), Research Associate, Laboratory of Experimental Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Goiman E.V., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Experimental Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Чумасова О.А. — к.м.н., врач-ревматолог, ревматологическое отделение, клиника иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Вольский Н.Н. — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Сизиков А.Э. — к.м.н., заведующий ревматологическим отделением, клиника иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Козлов В.А. — д.м.н., профессор, академик РАН, научный руководитель ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Chumasova O.A., PhD (Medicine), Clinical Rheumatologist, Department of Rheumatology, Clinic of Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Volskiy N.N., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Experimental Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Sizikov A.E., PhD (Medicine), Head, Department of Rheumatology, Clinic of Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Kozlov V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Scientific Director, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 13.05.2022
Принята к печати 28.05.2022

Received 13.05.2022
Accepted 28.05.2022