

DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-1-211-218

# Условия реализации феномена запрограммированной гибели нейтрофилов с появлением внеклеточных ДНК-ловушек при тромбообразовании

А.Н. Свешникова<sup>1-3</sup>, Е.А. Адаманская<sup>1, 3</sup>, М.А. Пантелеев<sup>1-3</sup><sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва<sup>3</sup>ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва

Формирование внеклеточных ДНК-ловушек нейтрофилов (NET-оз) – механизм запрограммированной клеточной смерти лейкоцитов, имеющий исходно антибактериальную и противогрибковую функции. Способность нейтрофилов активироваться при контакте с активированными тромбоцитами и, в свою очередь, активировать контактный путь свертывания с помощью ДНК-ловушек играет центральную роль в венозных тромбозах и диссеминированном внутрисосудистом свертывании крови при COVID-19. При этом внутриклеточная сигнализация, управляющая NET-озом, является крайне плохо понятной даже для простейших случаев, когда этот процесс вызывается липополисахаридами бактериальной стенки. В настоящем обзоре мы рассматриваем случай NET-оза при тромбозе, для которого вопросов еще больше. Внимание сосредоточено на условиях наблюдения NET-оза и особенностях его протекания при разных сценариях.

**Ключевые слова:** нейтрофилы, ДНК-ловушки, внутриклеточная сигнализация, тромбозы

Свешникова А.Н. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2024; 23 (1): 211–8. DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-1-211-218

## Conditions for the implementation of the phenomenon of programmed death of neutrophils with the appearance of DNA extracellular traps during thrombus formation

А.Н. Sveshnikova<sup>1-3</sup>, Е.А. Adamanskaya<sup>1, 3</sup>, М.А. Panteleev<sup>1-3</sup><sup>1</sup>Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow<sup>2</sup>M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow<sup>3</sup>Center for Theoretical Problems of Physical and Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow

The formation of DNA extracellular traps of neutrophils (NET-osis) is a mechanism of programmed cell death of leukocytes, which initially has antibacterial and antifungal functions. The ability of neutrophils to become activated upon contact with activated platelets and, in turn, to activate the contact coagulation pathway via DNA traps plays a central role in venous thrombosis and disseminated intravascular coagulation in COVID-19. At the same time, the intracellular signaling that controls NET-osis is extremely poorly understood even for the simplest cases, when this process is caused by lipopolysaccharides of the bacterial cell wall. In this review, we consider the case of NET-osis in thrombosis, for which there are even more questions. We focused on the conditions for NET-osis observation and features in different scenarios.

**Key words:** neutrophils, DNA-traps, intracellular signaling, thrombosis

Sveshnikova A.N., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2024; 23 (1): 211–8. DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-1-211-218

**В**неклеточные ДНК-ловушки (neutrophil extracellular traps, NETs) – «выбрасываемые» активированными нейтрофилами отрицательно заряженные нити ДНК с ассоциированными с ними активными ферментами нейтрофилов (рисунки 1А) – представляют собой антибактериальный и антигрибковый защитный механизм нейтрофильных гранулоцитов. Он широко распространен в животном мире – вплоть до таких беспозвоночных, как моллюски и актинии [1]. У людей внеклеточные ловушки могут создавать и другие иммунные клетки – макрофаги, моноциты, эозинофилы, базофилы, тучные клетки [2]. Формирование NETs (NET-оз)

имеет и патологическую сторону: оно сопровождается любой тромботический процесс, а в некоторых случаях является его причиной [3]. Аналогично процессу образования прокоагулянтных тромбоцитов как варианту клеточной смерти, вызванной гиперактивацией [4], NET-оз происходит в результате гиперактивации нейтрофилов, в частности активированными тромбоцитами [5]. При избыточной активации нейтрофилов в месте воспаления сосудистого эндотелия сети приходят в контакт с циркулирующей кровью и вызывают тромбообразование по внутреннему пути свертывания крови [6], что приводит, в частности, к венозным тромбозам [7].

© 2024 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Поступила 15.09.2023

Принята к печати 05.12.2023



EDN: UQHWLZ

### Контактная информация:

Свешникова Анастасия Никитична, д-р физ.-мат. наук, заведующая лабораторией клеточной биологии и трансляционной медицины ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России  
Адрес: 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1  
E-mail: a.sveshnikova@physics.msu.ru

© 2024 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 15.09.2023

Accepted 05.12.2023

### Correspondence:

Anastasia N. Sveshnikova, Dr. Sci. in Physics and Mathematics, Head of the Laboratory of Cellular Biology and Translational Medicine of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation  
Address: 1 Samory Mashela St., Moscow 117997, Russia  
E-mail: a.sveshnikova@physics.msu.ru

Настоящий обзор посвящен относительно недавно (2004 г. [8]) открытому механизму реализации защитной функции нейтрофилов, условиям наблюдения этого феномена NET-оза и различным сценариям его реализации, в особенности при тромбозе.

### Физиология и жизненный цикл нейтрофилов

Нейтрофилы являются самыми многочисленными ядерными клетками в крови человеческого организма [9]. Их количество может меняться в зависимости от наличия инфекций, воспаления и других патологий [10]. Ежедневно в костном мозге взрослого человека производится около  $10^{11}$  клеток, попадающих в кровь на несколько часов и потом мигрирующих в ткани, где они реализуют свои фагоцитарные функции и утилизируются тканевыми макрофагами. Жизненный цикл созревшего нейтрофила составляет 10–15 ч [11]. Тут стоит отметить, что частота митотических циклов предшественников гранулоцитов увеличивается и продукция гранулоцитов повышается при воспалительных процессах в организме. Помимо этого, образуется и другой пул клеток, состоящий из метамиелоцитов, палочкоядерных и сегментоядерных гранулоцитов [12].

На гранулоцитопозз влияет множество факторов роста, в первую очередь гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор и гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, продукция которых также изменяется при различных заболеваниях, в том числе при онкологии [12]. Нейтрофилы содержат множество гранул, которые делятся на два типа: первичные, характерные для промиело-

цитов и содержащие различные цитокины, активные ферменты-гидролазы и другие ферменты, в том числе миелопероксидазу (МРО) [13], и вторичные, формирующиеся в нейтрофилах на поздних стадиях созревания и содержащие В12-связывающий белок, лактоферрин и другие белки, при этом в зрелом сегментоядерном гранулоците 70–90% составляют вторичные гранулы, а оставшиеся 10–30% – первичные [14].

Отличие сегментоядерного гранулоцита от всех остальных заключается в наличии у ядра 2–5 сегментов, которые связаны хроматиновыми нитями (рисунки 1Б) [12]. К гранулоцитам или полиморфно-ядерным лейкоцитам относят нейтрофилы, базофилы и эозинофилы (рисунки 1В) [15].

Нейтрофилы или сегментоядерные лейкоциты являются первой линией защиты организма от патогенов, осуществляемой за счет фагоцитоза и дегрануляции [17]. Нейтрофилы являются одними из первых клеток, оказывающихся в области очага инфекции или повреждения, поэтому они передают активационный сигнал другим иммунным клеткам, генерируя набор цитокинов [17]. При фагоцитозе нейтрофилы поглощают патогены, уничтожая их за счет активных форм кислорода, генерируемых в фагосомах [18], но также они способны к секреции противомикробного содержимого своих гранул [18, 19]. Кроме того, нейтрофилы могут играть роль антиген-презентирующих клеток [20]. Избыточная функциональность нейтрофилов приводит к развитию аутовоспалительных заболеваний и хронического воспаления [21, 22], в то время как их недостаточное количество

### Рисунок 1

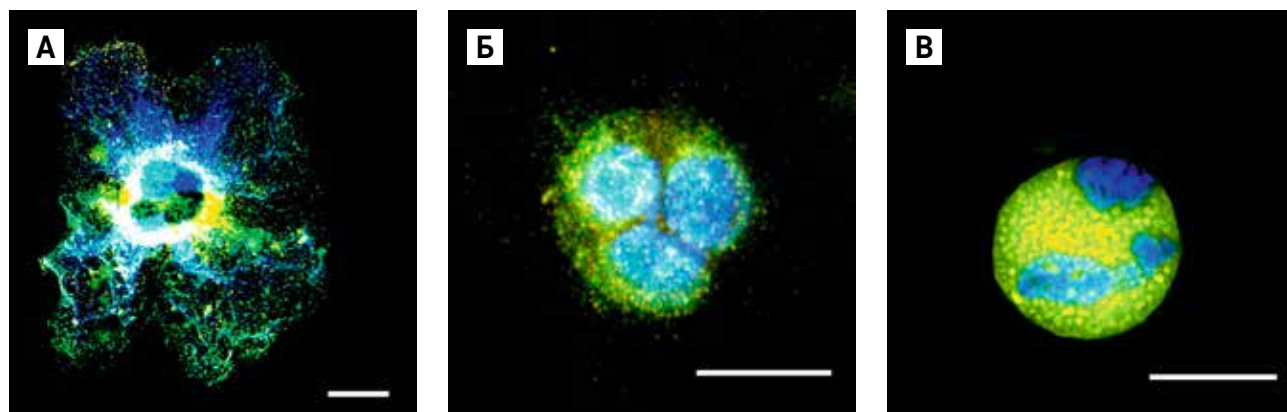
Конфокальная микроскопия PFA-фиксированных гранулоцитов. Адаптировано из [16]

Синий цвет – ДНК (окраска Hoechst33342); зеленый цвет – МРО; желтый цвет – эластаза (Ela; окраска флуоресцентно-мечеными антителами). Масштабный отрезок 10 мкм. А – типичный нейтрофил, испытавший суицидальный NET-оз, можно видеть нити ДНК, выходящие за пределы мембраны клетки; Б – типичный «спящий» нейтрофил, можно видеть сегменты ядра и гранулы; В – типичный эозинофил, можно видеть два сегмента ядра и четко отделяемые богатые Ela азурофильные гранулы

### Figure 1

Confocal microscopy of PFA-fixed granulocytes. Adapted from [16]

Blue – DNA (staining with Hoechst33342); green – myeloperoxidase; yellow – elastase (staining with fluorescently labeled antibodies). Scale bar: 10  $\mu$ m. А – typical neutrophil that has experienced suicidal NET-osis, strands of DNA extending beyond the cell membrane could be distinguished; Б – typical whole neutrophil, nuclear segments and granules could be distinguished; В – typical eosinophil, two nuclear segments and clearly distinguishable elastase-rich azurophilic granules could be distinguished



или активность – к бактериальным и грибковым инфекциям [23].

В месте воспаления нейтрофилы оказываются благодаря их способности двигаться против градиента хемоаттрактантов [24], выделяемых клетками организма (например, лиганды СХС-рецепторов (CXCL)) [25, 26], бактериями (например, липополисахариды (LPS)) [27–29], активированными тромбоцитами (например, интерлейкин-8) [24, 30] или самими нейтрофилами (например, интерлейкины и фактор некроза опухоли- $\alpha$ ) [31]. Направляясь градиентом, нейтрофилы мигрируют за счет адгезии к другим клеткам, обеспечиваемой селектинами и интегринами [32]. Стоит отметить, что основные нейтрофильные интегрины  $\alpha$ M $\beta$ 2 (CD11b/CD18, MAC-1) [33] и  $\alpha$ X $\beta$ 2 (CD11c/CD18) [34] способны связывать белки плазмы крови – фибриноген, фибронектин и фактор Виллебранда, через которые может происходить их контакт с тромбоцитами [35]. Кроме того, пары Р-селектин–PSGL также обеспечивают образование тромбоцитарно-нейтрофильных гетероагрегатов [36]. Третий интегрин нейтрофилов,  $\alpha$ L $\beta$ 2 (CD11a/CD18), связывается напрямую с клетками эндотелия через молекулы ICAM-1 [37].

#### **Феномен образования ДНК-ловушек, условия наблюдения, значимость при тромбозах**

Тромбоциты и нейтрофилы – клетки крови, выполняющие разные функции. Сегментоядерные лейкоциты являются критическими компонентами врожденной иммунной системы, тем самым играя важную роль в защите организма от патогенов. Основная функция тромбоцитов заключается в их участии в свертываемости крови и предотвращении кровотечения. Однако при различных основных функциях эти клетки должны взаимодействовать при самых различных условиях, таких как воспалительные процессы, травмы и инфекции [38, 39].

В случае воспаления или повреждения сосудистого эндотелия тромбоциты быстро адгезируют к активированным эндотелиоцитам или белкам межклеточного матрикса и образуют тромб [40]. При маленьких повреждениях они могут мигрировать в область стыков между эндотелиоцитами и способствовать перекрытию повреждений и без образования тромба [41, 42]. В свою очередь, нейтрофилы проникают в область раны, фагоцитируют бактерии и производят цитокины, которые привлекают другие белые кровяные клетки для борьбы с инфекцией [43]. Так как эти клетки работают вместе, то тромбоциты при воспалении посылают сигналы нейтрофилам, привлекая их к месту воспаления, а гранулоциты, в свою очередь, могут влиять на тромбоциты, провоцируя их агрегацию и активацию [44]. Суммарно это взаимодействие называют тромбовоспалением [45]

или иммунотромбозом [46], в зависимости от инициатора [47].

Впервые NET-оз наблюдался методами иммунофлуоресцентной и электронной микроскопии при фагоцитозе нейтрофилами бактерий [8], при этом было обнаружено, что бактерии застревают в этих сетях. После активации бактериями или иными патогенами, высвобождение NETs наблюдается через время от 30 мин до нескольких часов [27, 48]. В качестве модельного активатора, вызывающего NET-оз от 20 до 80% нейтрофилов [49, 50], является форбол-12-миристат-13-ацетат (PMA) – активатор протеинкиназы C (PKC) [49, 51]. Альтернативным, более физиологическим агентом, *in vitro* вызывающим NET-оз от 30 до 50% нейтрофилов [29, 49, 52], является компонент клеточной стенки грамотрицательных бактерий – LPS, действующий на Toll-подобные рецепторы, в первую очередь на TLR4 [29, 49].

В процессе NET-оза нейтрофилы претерпевают изменения в собственной морфологии. Разрывается ядерная оболочка и высвобождается хроматин. Гранулярные белки выходят из гранул в цитоплазме клетки и затем перемешиваются с нитями ДНК. Таким образом, во внеклеточное пространство попадает структура, состоящая из нитей ДНК, антимикробных пептидов и гистонов [53, 54]. Обязательным условием выбрасывания сетей является активация нейтрофила, т. е. если клетка находилась в покое, то в норме NET-оз начаться не должен [55, 56].

Существует два основных механизма образования NET-ов: витальный и суицидальный. Главное отличие данных механизмов заключается в том, что при витальном NET-озе нейтрофилы сохраняют свои фагоцитарные функции и целостность плазматической мембраны [53], при этом ДНК не выплескивается в виде нитей, а выделяется клеткой в виде компактных везикул (рисунки 2А). Классический суицидальный NET-оз сопровождается образованием сетей, на которых расположены активированные ферменты нейтрофилов – Ela и MPO (рисунки 2Б) [53, 57].

Помимо этих ситуаций ДНК-ловушки могут способствовать развитию тромбоза. Связано это с тем, что сети активируют тромбоциты, а также каскад свертывания по контактному пути [7, 58]. Такое патогенное действие проявляется в таких заболеваниях, как тромбоз глубоких вен, легочная эмболия, сепсис и др. [7, 44, 59]. Сейчас считается, что для ряда важных заболеваний, включая венозный тромбоз [7, 60] и системное свертывание крови при COVID-19 [47, 61], активация свертывания крови ДНК-ловушками нейтрофилов является ведущим механизмом развития. Эксперименты на приматах показали, что ингибиторы взаимодействия Р-селектин–PSGL-1, блокирующие активацию нейтрофилов тромбоци-

**Рисунок 2**

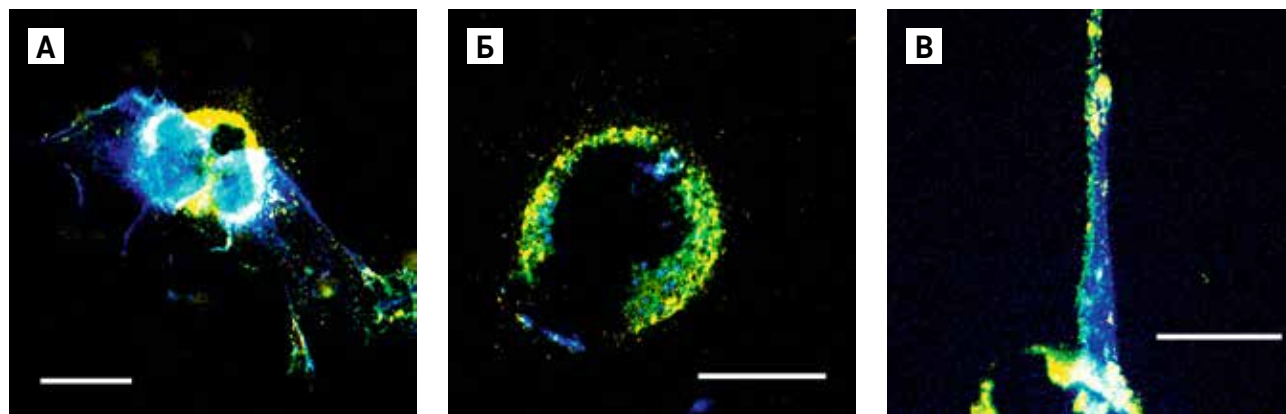
Конфокальная микроскопия PFA-фиксированных нейтрофилов. Адаптировано из [16]

Синий цвет – ДНК (окраска Hoechst33342); зеленый цвет – МРО; желтый цвет – Ela (окраска флуоресцентно-мечеными антителами). Масштабный отрезок 10 мкм. А – типичный нейтрофил, испытавший суицидальный NET-оз, можно видеть нити ДНК, выходящие за пределы мембраны клетки; Б – типичный нейтрофил, испытавший витальный NET-оз, можно видеть отдельные гранулы, содержащие ДНК; В – типичный встречающийся тяж NET-оза при суицидальном NET-озе

**Figure 2**

Confocal microscopy of PFA-fixed neutrophils. Adapted from [16]

Blue – DNA (staining with Hoechst33342); green – myeloperoxidase; yellow – elastase (staining with fluorescently labeled antibodies). Scale bar: 10  $\mu$ m. A – in a typical neutrophil that has experienced suicidal NET disease, strands of DNA can be seen extending beyond the cell membrane; B – in a typical neutrophil that has experienced vital NET disease, individual granules containing DNA can be seen; C – a typical NET strand found in suicidal NET disease



тами, подавляют венозный тромбоз лучше, чем классическая терапия гепарином [62].

Однако важно подчеркнуть, что NET-оз в таких условиях может протекать по совсем иным механизмам и управляться иными путями сигнализации, нежели канонические модельные схемы. Поэтому ниже это различие будет отмечаться особо.

Разумеется, если NET-оз и тромбоз идут при сепсисе на фоне острого воспаления, то активация нейтрофилов в тромбозе может происходить как по классическим механизмам, так и по тромботическим.

### **Механизмы суицидального и витального NET-оза**

Суицидальный вариант NET-оза – это классический вариант с появлением сетей (рисунки 1А, 2Б). Сами ДНК-ловушки представляют собой паутиноподобные нити, диаметр которых может быть в пределах нескольких микрон (рисунок 2В) [57], а длина – до нескольких десятков микрон [63, 64]. В экспериментах *in vitro* такой вариант наблюдается в первую очередь при активации нейтрофилов PMA, т. е. в результате активности протеинкиназы С [27]. Активация протеинкиназы С может происходить и в физиологических условиях. Например, при активации СХС-рецепторов их лигандами (интерлейкины и CXCL) происходит  $\beta\gamma$ -активация фосфолипазы С, что приводит к активации классических изоформ PKC [65]. Активная PKC приводит к активации NADPH-оксидазы (NADPH oxidases, NOX) нейтрофилов, что ведет к высвобождению активных форм кислорода (reactive oxygen species, ROS), а также апоптотическим событиям, таким как открытие митохондриальных пор [66] и выход цитохрома с [67, 68].

Процесс суицидального NET-оза протекает в строго определенной последовательности стадий (рисунок 3 [56]). Первая стадия NET-оза характеризуется активацией NOX за счет PKC-зависимого фосфорилирования ее субъединиц [69]. Источниками ROS в нейтрофилах являются не только NOX, но и митохондрии клетки, активирующиеся в результате кальциевой сигнализации [66]. В некоторых исследованиях отмечено, что при гранулематозе при сниженном значении NADPH образование ДНК-ловушек значительно снижено [70].

По мере того как вырабатывается ROS, ДНК начинает раскручиваться и постепенно растягиваться, что связано с процессом цитруллинирования гистонов [71], а также с деполимеризацией цитоскелета [72]. ROS приводят к распаду мембран гранул и фагосом [73–75], в результате в цитозоль выбрасываются ферменты МРО и Ela [75]. Ela разрушает цитоскелет и мигрирует в ядро, где происходит расщепление гистонов, деконденсация хроматина и разрыв ядерной оболочки [47, 53, 76]. Одной из важных составляющих процесса является зависимость от MAPK-каскада и кальция активация пептидил-аргинин деиминазы 4 (PAD4), которая превращает остатки аргинина гистонов в цитруллин, в результате чего исчезает заряд гистонов и снижается их взаимодействие с ДНК [56], что приводит к деконденсации хроматина, являющейся отличительной особенностью NET-оза.

После разрыва ядерной мембраны следует так называемое смешивание содержимого ядра и гранул. В процессе этого среди нитей хроматина находятся белки и ферменты гранул нейтрофилов. Такое сочетание придает сетям различные антимикробные свойства. Последним этапом NET-оза является вытес-



## Рисунок 3

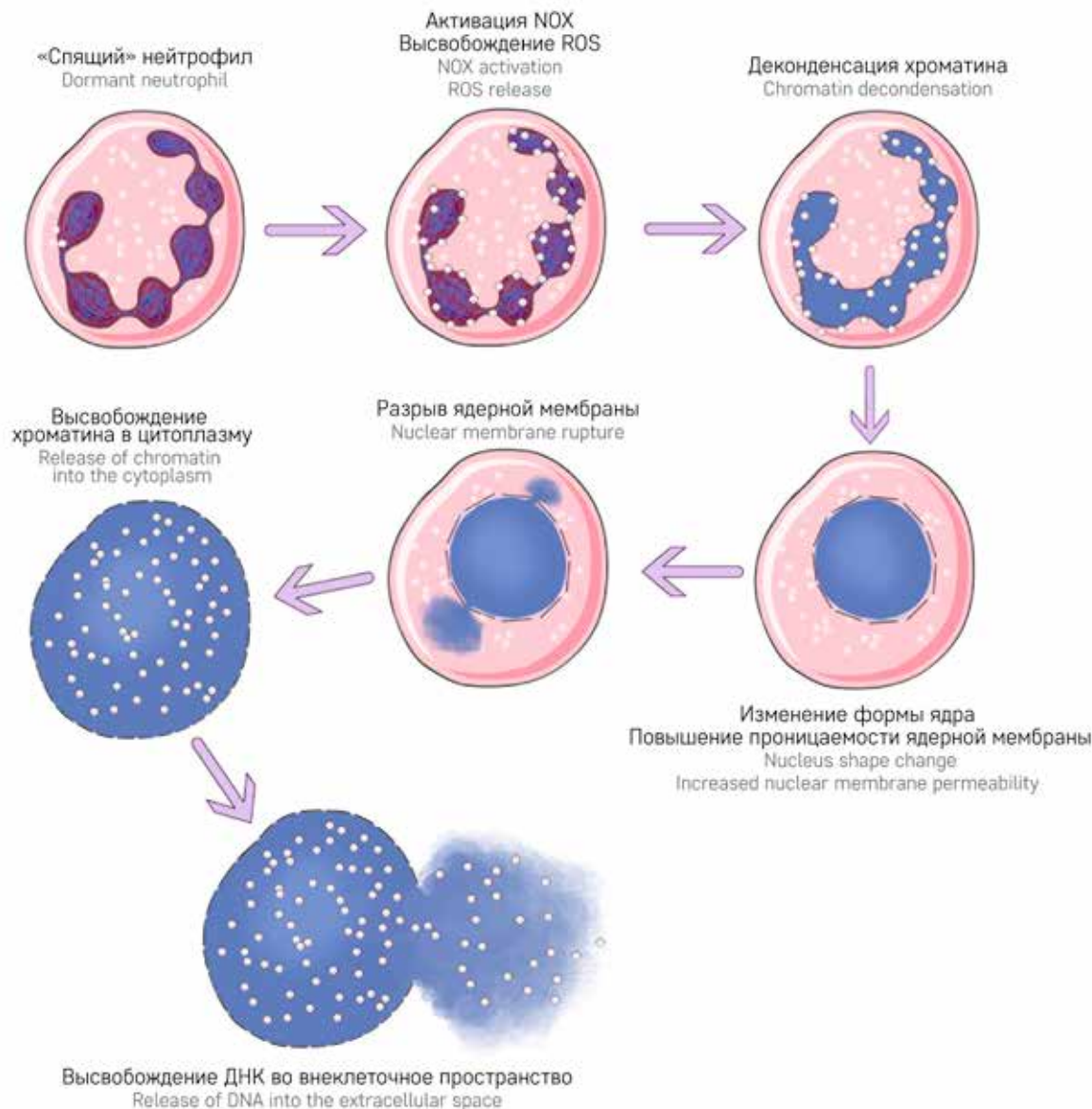
Стадии протекания суицидального NET-оза. Адаптировано из [56]

При контакте с активатором в «спящем» нейтрофиле происходят активация NOX и генерация ROS (белые кружки), что приводит к окислению гистонов (красный цвет), деконденсации хроматина и расплетению ДНК (синий цвет). ROS-опосредованное увеличение проницаемости ядерной мембраны приводит к изменению формы ядра и в дальнейшем к выходу ДНК в цитоплазму. Дальнейшее действие ROS и активных гидролаз нейтрофильных гранул приводит к разрыву плазматической мембраны и высвобождению ДНК во внеклеточное пространство

Figure 3

Stages of suicidal NET-osis. Adapted from [56]

Upon contact with an activator in a dormant neutrophil, NOX is activated and ROS are generated (white circles), which leads to histone oxidation (red), chromatin decondensation and DNA uncoiling (blue). A ROS-mediated increase in the nuclear membrane permeability leads to a change in the shape of the nucleus and, subsequently, the release of DNA into the cytoplasm. Further action of ROS and active hydrolases of neutrophil granules leads to rupture of the plasma membrane and release of DNA into the extracellular space



нение сетей во внеклеточное пространство. Находясь там, они начинают улавливать и уничтожать посторонние для организма патогены. Разрыв как ядерной, так и плазматической мембраны происходит вследствие увеличения объема воды, ассоциированной с ДНК в отсутствие компенсирующих зарядов. При этом разрыв мембран считается управляемым процессом, однако его физико-химические механизмы до конца не изучены [53, 73].

Прижизненный (витальный) NET-оз, или NET-оз II типа, характеризуется тем, что в его процессе

клетка выбрасывает ДНК, но не погибает. В отличие от суицидального типа витальный NET-оз запускается другими стимулами, в первую очередь LPS и цитокинами, а также не зависит от NOX и активных форм кислорода [77]. Активация витального NET-оза связана с ответом организма на различные типы микробных патогенов [78], при этом она не требует длительного времени на окисление мембран и их физическое разрушение, поэтому активация NET-оза вызывается достаточно быстро и не требует часов, как в случае с РМА. Ключевым ферментом

в витальном NET-озе считается деиминаза PAD4, в частности деимилирующая аргинин в гистонах, что приводит к расплечению ДНК [72]. Считается, что при расплечении ДНК ядерная мембрана образует везикулы, которые содержат нити ДНК. Эти везикулы, предположительно, образуются из внешней ядерной оболочки, а затем сливаются с клеточной мембраной. При этом ядерная и клеточные мембраны не разрушаются [78, 79]. Это позволяет нейтрофилам продолжать защищать организм от воздействия инородных патогенов. В частности, PAD4 важен для формирования и участия NETs при тромбозе: у нокаутных по PAD4 мышей не только отсутствует NET-оз при стимуляции основными агонистами, но также практически не получается вызвать тромбоз глубоких вен [80].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время NET-оз рассматривается как ключевой патологический фактор тромбозов различной этиологии. Однако сам по себе феномен NET-оза, по-видимому, является гетерогенным: существует как минимум два основных варианта (суицидальный и витальный), а также множество способов и

условий активации, которые приводят к разным вариантам протекания и разным результатам. Огромное и быстро растущее количество литературных источников по NET-озу содержит много противоречий, связанных с типом и условиями активации (обычно исследователи выбирают ограниченное число вариантов), выбором животных (больше всего данных о роли NETs *in vivo* на мышах, но есть основания считать, что там есть крупные отличия от приматов), способом наблюдения. Подавляющее большинство результатов по NET-озу получено в условиях, отличающихся от NET-оза при тромбозе, и это необходимо учитывать при попытке получить цельную картину.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации №075-15-2022-242.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

## ORCID

**Sveshnikova A.N.** ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4720-7319>

**Adamanskaya E.A.** ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-4828-4063>

**Panteleev M.A.** ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8128-7757>

## Литература

1. Robb C.T., Dyrinda E.A., Gray R.D., Rossi A.G., Smith V.J. Invertebrate Extracellular Phagocyte Traps Show That Chromatin Is an Ancient Defence Weapon. *Nat Commun* 2014; 5: 4627. DOI: 10.1038/ncomms5627
2. Daniel C., Leppkes M., Muñoz L.E., Schley G., Schett G., Herrmann M. Extracellular DNA Traps in Inflammation, Injury and Healing. *Nat Rev Nephrol* 2019; 15: 559–75. DOI: 10.1038/s41581-019-0163-2
3. Palacios-Acedo A.L., Mège D., Crescence L., Dignat-George F., Dubois C., Panicot-Dubois L. Platelets, Thrombo-Inflammation, and Cancer: Collaborating With the Enemy. *Front Immunol* 2019; 10: 1805. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01805
4. Sveshnikova A.N., Ataullakhanov F.I., Panteleev M.A. Compartmentalized Calcium Signaling Triggers Subpopulation Formation upon Platelet Activation through PAR1. *Mol Biosyst* 2015; 11: 1052–60. DOI: 10.1039/c4mb00667d
5. Cadrillier A., Kessenbrock K., Gilliss B.M., Nguyen J.X., Marques M.B., Monestier M., et al. Platelets Induce Neutrophil Extracellular Traps in Transfusion-Related Acute Lung Injury. *J Clin Invest* 2012; 122: 2661–71. DOI: 10.1172/JCI61303
6. Golas A., Parhi P., Dimachkie Z.O., Siedlecki C.A., Vogler E.A. Surface-Energy Dependent Contact Activation of Blood Factor XII. *Biomaterials* 2010; 31: 1068–79. DOI:10.1016/j.biomaterials.2009.10.039
7. Fuchs T.A., Brill A., Wagner D.D. Neutrophil Extracellular Trap (NET) Impact on Deep Vein Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32: 1777–83. DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.242859
8. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* 2004; 303: 1532–5. DOI: 10.1126/science.1092385
9. Rosales C. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? *Front Physiol* 2018; 9: 113.
10. Козлов С.О., Кудрявцев И.В., Грудина Н.А., Костевич В.А., Панасенко О.М., Соколов А.В., Васильев В.Б. Активированные нейтрофилы, продуцирующие HOCL, выявляющиеся при проточной цитометрии и конфокальной микроскопии с помощью целестинового синего В. *Acta Biomedica Scientifica* 2016; 1 (3(2)): 86–91. DOI: 10.12737/article\_590823a4895537.04307905 [Kozlov S.O., Kudryavtsev I.V., Grudinina N.A., Kostevich V.A., Panasenkov O.M., Sokolov A.V., Vasilyev V.B. Activated producing HOCL neutrophils revealed by flow cytometry and confocal microscopy with celestine blue B. *Acta Biomedica Scientifica* 2016; 1 (3(2)): 86–91. (In Russ.)].
11. Bratton D.L., Henson P.M. Neutrophil Clearance: When the Party Is over, Clean-up Begins. *Trends Immunol* 2011; 32: 350–7. DOI: 10.1016/j.it.2011.04.009
12. Hoffbrand V., Vyas P., Campo E., Haferlach T., Gomez K. *Color Atlas of Clinical Hematology: Molecular and Cellular Basis of Disease*. John Wiley & Sons; 2019. ISBN 978-1-119-05701-7.
13. Borregaard N., Sørensen O.E., Theilgaard-Mönch K. Neutrophil Granules: A Library of Innate Immunity Proteins. *Trends Immunol* 2007; 28: 340–5. DOI:10.1016/j.it.2007.06.002
14. Погорелов В., Козинцев Г., Дягилева О., Луговская С., Проценко Д., Сарычева Т. Гематологический атлас. Настольное руководство врача-лаборанта. *Litres*; 2022. ISBN 978-5-04-256439-0. [Pogorelov V., Kozinets G., Diaghileva O., Lugovskaya S., Protsenko D., Sarycheva T. *Hematological atlas. Laboratory physician's desk*

- manual. Litres; 2022. ISBN 978-5-04-256439-0. [In Russ.]].
15. Murphy K.M., Weaver C. Janeway's Immunobiology; Garland Science/ Taylor & Francis Group, LLC; 2017. ISBN 978-0-8153-4505-3.
  16. Адаманская Е.А., Юшкова Е.В., Федорова Д.В., Соколов А.В., Подоплелова Н.А., Свешникова А.Н. Методика наблюдения ДНК-ловушек нейтрофилов в образцах крови педиатрических пациентов. Сборник тезисов XXIV съезда физиологического общества им. И.П. Павлова. СПб.: ООО «Издательство ВВМ»; 2023. [Adamanskaya E.A., Yushkova E.B., Fedorova D.V., Sokolov A.V., Podoplelova N.A., Sveshnikova A.N. Methodology for Observing Neutrophil DNA Traps in Blood Samples of Pediatric Patients. Abstracts of the XXIV Congress of the Physiological Society named after I.P. Pavlov. St. Petersburg: VVM Publishing House LLC; 2023.
  17. Nathan C. Neutrophils and Immunity: Challenges and Opportunities. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 173–82. DOI: 10.1038/nri1785
  18. Segal A.W. How Neutrophils Kill Microbes. *Ann Rev Immunol* 2005; 23: 197–223. DOI: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115653
  19. Mayadas T.N., Cullere X., Lowell C.A. The Multifaceted Functions of Neutrophils. *Annu Rev Pathol* 2014; 9: 181–218. DOI: 10.1146/annurev-pathol-020712-164023
  20. Witko-Sarsat V., Rieu P., Descamps-Latscha B., Lesavre P., Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: Molecules, Functions and Pathophysiological Aspects. *Lab Invest* 2000; 80: 617–53. DOI: 10.1038/labinvest.3780067
  21. Smith C.K., Kaplan M.J. The Role of Neutrophils in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 2015; 27: 448. DOI: 10.1097/BOR.0000000000000197
  22. Yu Y., Su K. Neutrophil Extracellular Traps and Systemic Lupus Erythematosus. *J Clin Cell Immunol* 2013; 4: 139. DOI: 10.4172/2155-9899.1000139
  23. Summers C., Rankin S.M., Condliffe A.M., Singh N., Peters A.M., Chilvers E.R. Neutrophil Kinetics in Health and Disease. *Trends Immunol* 2010; 31: 318–24. DOI: 10.1016/j.it.2010.05.006
  24. Petri B., Sanz M.-J. Neutrophil Chemotaxis. *Cell Tissue Res* 2018; 371: 425–36. DOI: 10.1007/s00441-017-2776-8
  25. Murphy P.M. Neutrophil Receptors for Interleukin-8 and Related CXC Chemokines. *Semin Hematol* 1997; 34: 311–8.
  26. Schoenwaelder S.M., Ruggeri Z.M., Westein E., Kaplan Z.S., Jackson S.P., Ashworth K.J., et al. The CXCR1/2 Ligand NAP-2 Promotes Directed Intravascular Leukocyte Migration through Platelet Thrombi. *Blood* 2013; 121: 4555–66. DOI: 10.1182/blood-2012-09-459636
  27. Damascena H.L., Silveira W.A.A., Castro M.S., Fontes W. Neutrophil Activated by the Famous and Potent PMA (Phorbol Myristate Acetate). *Cells* 2022; 11: 2889. DOI: 10.3390/cells11182889
  28. Karpurapu M., Lee, Y.G., Qian Z., Wen J., Ballinger M.N., Rusu L., et al. Inhibition of Nuclear Factor of Activated T Cells (NFAT) C3 Activation Attenuates Acute Lung Injury and Pulmonary Edema in Murine Models of Sepsis. *Oncotarget* 2018; 9: 10606–20. DOI: 10.18632/oncotarget.24320
  29. Zanon I., Ostuni R., Capuano G., Collini M., Caccia M., Ronchi A.E., et al. CD14 Regulates the Dendritic Cell Life Cycle after LPS Exposure through NFAT Activation. *Nature* 2009; 460 (7252): 264–8. DOI: 10.1038/nature08118
  30. Businaro R., Scaccia E., Bordin A., Pagano F., Corsi M., Siciliano C., et al. Platelet Lysate-Derived Neuropeptide Influences Migration and Angiogenesis of Human Adipose Tissue-Derived Stromal Cells. *Sci Rep* 2018; 8: 14365. DOI: 10.1038/s41598-018-32623-8
  31. Cassatella M.A. The Neutrophil: An Emerging Regulator of Inflammatory and Immune Response. Karger Medical and Scientific Publishers; 2003. ISBN 978-3-8055-7552-2.
  32. Lindbom L., Werr J. Integrin-Dependent Neutrophil Migration in Extravascular Tissue. *Semin Immunol* 2002; 14: 115–21. DOI: 10.1006/smim.2001.0348
  33. Pluskota E., Soloviev D.A., Szpak D., Weber C., Plow E.F. Neutrophil Apoptosis: Selective Regulation by Different Ligands of Integrin  $\alpha$ M $\beta$ 2. *J Immunol* 2008; 181: 3609–19.
  34. Ugarova T.P., Yakubenko V.P. Recognition of Fibrinogen by Leukocyte Integrins. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 936: 368–85. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb03523.x
  35. Zarbock A., Ley K. Platelet-Neutrophil-Interactions: Linking Hemostasis and Inflammation. *Blood Rev* 2007; 21 (2): 99–111. DOI: 10.1016/j.blre.2006.06.001
  36. Yago T., Shao B., Miner J.J., Yao L., Klopocki A.G., Maeda K., et al. E-Selectin Engages PSGL-1 and CD44 through a Common Signaling Pathway to Induce Integrin  $\alpha$ L $\beta$ 2-Mediated Slow Leukocyte Rolling. *Blood* 2010; 116: 485–94. DOI: 10.1182/blood-2009-12-259556
  37. Zhou F., Zhang F., Zarnitsyna V.I., Doudy L., Yuan Z., Li K., et al. The Kinetics of E-Selectin- and P-Selectin-Induced Intermediate Activation of Integrin  $\alpha$ L $\beta$ 2 on Neutrophils. *J Cell Sci* 2021; 134: jcs258046. DOI: 10.1242/jcs.258046
  38. Jenne C.N., Kubes P. Platelets in Inflammation and Infection. *Platelets* 2015; 26: 286–92. DOI: 10.3109/09537104.2015.1010441
  39. Koupnova M., Corkrey H.A., Vitseva O., Manni G., Pang C.J., Clancy L., et al. The Role of Platelets in Mediating a Response to Human Influenza Infection. *Nat Commun* 2019; 10: 1780. DOI: 10.1038/s41467-019-09607-x
  40. Sveshnikova A., Stepanyan M., Panteleev M. Platelet Functional Responses and Signalling: The Molecular Relationship. Part 1: Responses. *Systems Biol Physiol Rep* 2021; 1: 20. DOI: 10.52455/sbpr.01.202101014
  41. Nicolai L., Schiefelbein K., Lipsky S., Leunig A., Hoffknecht M., Pekayvaz K., et al. Vascular Surveillance by Haptotactic Blood Platelets in Inflammation and Infection. *Nat Commun* 2020; 11: 5778. DOI: 10.1038/s41467-020-19515-0
  42. Gros A., Syvannarath V., Lamrani L., Ollivier V., Loyau S., Goerge T., et al. Single Platelets Seal Neutrophil-Induced Vascular Breaches via GPVI during Immune-Complex-Mediated Inflammation in Mice. *Blood* 2015; 126: 1017–26. DOI: 10.1182/blood-2014-12-617159
  43. Knorr D.A., Bachanova V., Verneris M.R., Miller J.S. Clinical Utility of Natural Killer Cells in Cancer Therapy and Transplantation. *Semin Immunol* 2014; 26: 161–72. DOI: 10.1016/j.smim.2014.02.002
  44. Shannon O. The Role of Platelets in Sepsis. *Res Pract Thromb Haemost* 2021; 5: 27–37. DOI: 10.1002/rth2.12465
  45. Schattner M., Jenne C.N., Negrotto S., Ho-Tin-Noe B. Editorial: Platelets and Immune Responses During Thromboinflammation. *Front Immunol* 2020; 11: 1079. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01079
  46. Bonaventura A., Vecchié A., Dagna L., Martinod K., Dixon D.L., van Tassel B.W., et al. Endothelial Dysfunction and Immunothrombosis as Key Pathogenic Mechanisms in COVID-19. *Nat Rev Immunol* 2021; 21: 319–29. DOI: 10.1038/s41577-021-00536-9
  47. Zhu Y., Chen X., Liu X. NETosis and Neutrophil Extracellular Traps in COVID-19: Immunothrombosis and Beyond. *Front Immunol* 2022; 13: 838011. DOI: 10.3389/fimmu.2022.838011
  48. de Bont C.M., Koopman W.J.H., Boelens W.C., Puijn G.J.M. Stimulus-Dependent Chromatin Dynamics, Citrullination, Calcium Signalling and ROS Production during NET Formation.

- Biochim Biophys Acta Mol Cell Res 2018; 1865: 1621–9. DOI:10.1016/j.bbamcr.2018.08.014
49. Khan M.A., Farahvash A., Douda D.N., Licht, J.-C., Grasmann H., Swezey N., Palaniyar N. JNK Activation Turns on LPS- and Gram-Negative Bacteria-Induced NADPH Oxidase-Dependent Suicidal NETosis. *Sci Rep* 2017; 7: 3409. DOI: 10.1038/s41598-017-03257-z
  50. Agarwal S., Loder S., Cholok D., Li J., Bian G., Yalavarthi S., et al. Disruption of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) Links Mechanical Strain to Post-Traumatic Inflammation. *Front Immunol* 2019; 10: 2148. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02148
  51. Pai D., Gruber M., Pfähler S.-M., Bredthauer A., Lehle K., Trabold B. Polymorphonuclear Cell Chemotaxis and Suicidal NETosis: Simultaneous Observation Using fMLP, PMA, H7, and Live Cell Imaging. *J Immunol Res* 2020; 2020: e1415947. DOI: 10.1155/2020/1415947
  52. Arroyo R., Khan M.A., Echaide M., Pérez-Gil J., Palaniyar N. SP-D Attenuates LPS-Induced Formation of Human Neutrophil Extracellular Traps (NETs), Protecting Pulmonary Surfactant Inactivation by NETs. *Commun Biol* 2019; 2: 1–13. DOI: 10.1038/s42003-019-0662-5
  53. Papayannopoulos V. Neutrophil Extracellular Traps in Immunity and Disease. *Nat Rev Immunol* 2018; 18: 134–47. DOI: 10.1038/nri.2017.105
  54. 孝泰野村 NETosis. *日本小児アレルギー学会誌* 2019; 33: 348–9. DOI: 10.3388/jspaci.33.348
  55. Remijsen Q., Kuijpers T.W., Wirawan E., Lippens S., Vandenabeele P., Vanden Berghe T. Dying for a Cause: NETosis, Mechanisms behind an Antimicrobial Cell Death Modality. *Cell Death Differ* 2011; 18: 581–8. DOI: 10.1038/cdd.2011.1
  56. Thiam H.R., Wong S.L., Wagner D.D., Waterman C.M. Cellular Mechanisms of NETosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2020; 36: 191–218. doi: 10.1146/annurev-cellbio-020520-111016
  57. Stoimenou M., Tzoros G., Skendros P., Chrysanthopoulou A. Methods for the Assessment of NET Formation: From Neutrophil Biology to Translational Research. *Int J Mol Sci* 2022; 23: 15823. DOI: 10.3390/ijms232415823
  58. Andrews R.K., Arthur J.F., Gardiner E.E. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) and the Role of Platelets in Infection. *Thromb Haemost* 2014; 112: 659–65. DOI: 10.1160/TH14-05-0455
  59. Balázs A., Mall M.A. Mucus Obstruction and Inflammation in Early Cystic Fibrosis Lung Disease: Emerging Role of the IL-1 Signaling Pathway. *Pediatr Pulmonol* 2019; 54: S5–12. DOI: 10.1002/ppul.24462
  60. Martinod K., Witsch T., Farley K., Galant M., Remold-O'Donnell E., Wagner D.D. Neutrophil Elastase-Deficient Mice Form Neutrophil Extracellular Traps in an Experimental Model of Deep Vein Thrombosis. *J Thromb Haemost* 2016; 14 (3): 551–8. DOI: 10.1111/jth.13239
  61. Martyanov A.A., Boldova A.E., Stepanyan M.G., An O.I., Gur'ev A.S., Kassina D.V., et al. Longitudinal Multiparametric Characterization of Platelet Dysfunction in COVID-19: Effects of Disease Severity, Anticoagulation Therapy and Inflammatory Status. *Thromb Res* 2022; 211: 27–37. DOI: 10.1016/j.thromres.2022.01.013
  62. Ramacciotti E., Myers D.D., Wroblewski S.K., Deatrick K.B., Lundy F.J., Rectenwald J.E., et al. P-Selectin/PSGL-1 Inhibitors versus Enoxaparin in the Resolution of Venous Thrombosis: A Meta-Analysis. *Thromb Res* 2010; 125: e138–42. DOI: 10.1016/j.thromres.2009.10.022
  63. Lee K.H., Kronbichler A., Park D.D.-Y., Park Y., Moon H., Kim H., et al. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Autoimmune Diseases: A Comprehensive Review. *Autoimmun Rev* 2017; 16: 1160–73. DOI: 10.1016/j.autrev.2017.09.012
  64. Mesa M.A., Vasquez G. NETosis. *Autoimmune Diseases* 2013; 2013: e651497. DOI: 10.1155/2013/651497
  65. Philip F., Kadamur G., Silos R.G., Woodson J., Ross E.M. Synergistic Activation of Phospholipase C- $\beta$ 3 by  $G_{\alpha q}$  and  $G_{\beta \gamma}$  Describes a Simple Two-State Coincidence Detector. *Curr Biol* 2010; 20: 1327–35. DOI: 10.1016/J.CUB.2010.06.013
  66. Vorobjeva N., Galkin I., Pletjushkina O., Golyshev S., Zinovkin R., Prikhodko A. et al. Mitochondrial Permeability Transition Pore Is Involved in Oxidative Burst and NETosis of Human Neutrophils. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2020; 1866: 165664. DOI: 10.1016/j.bbdis.2020.165664
  67. Yang C., Wang Z., Li L., Zhang Z., Jin X., Wu P., et al. Aged Neutrophils Form Mitochondria-Dependent Vital NETs to Promote Breast Cancer Lung Metastasis. *J Immunother Cancer* 2021; 9: e002875. DOI: 10.1136/jitc-2021-002875
  68. Luo H.R., Loison F. Constitutive Neutrophil Apoptosis: Mechanisms and Regulation. *Am J Hematol* 2008; 83: 288–95. DOI: 10.1002/ajh.21078
  69. Fuchs T.A., Abed U., Goosmann C., Hurwitz R., Schulze I., Wahn V., et al. Novel Cell Death Program Leads to Neutrophil Extracellular Traps. *J Cell Biol* 2007; 176: 231–41. DOI: 10.1083/jcb.200606027
  70. Bianchi M., Hakkim A., Brinkmann V., Siler U., Seger R.A., Zychlinsky A., et al. Restoration of NET Formation by Gene Therapy in CGD Controls Aspergillosis. *Blood* 2009; 114: 2619–22. DOI: 10.1182/blood-2009-05-221606
  71. Saffarzadeh M., Juenemann C., Queisser M.A., Lochner G., Barreto G., Galuska S.P., et al. Neutrophil Extracellular Traps Directly Induce Epithelial and Endothelial Cell Death: A Predominant Role of Histones. *PLoS One* 2012; 7: e32366. DOI: 10.1371/journal.pone.0032366
  72. Thiam H.R., Wong S.L., Qiu R., Kit-tisopikul M., Vahabikashi A., Goldman A.E., et al. NETosis Proceeds by Cytoskeleton and Endomembrane Disassembly and PAD4-Mediated Chromatin Decondensation and Nuclear Envelope Rupture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020; 117: 7326–37. DOI: 10.1073/pnas.1909546117
  73. Metzler K.D., Goosmann C., Lubojemska A., Zychlinsky A., Papayannopoulos V. A Myeloperoxidase-Containing Complex Regulates Neutrophil Elastase Release and Actin Dynamics during NETosis. *Cell Rep* 2014; 8: 883–96. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.06.044
  74. Chen T., Li Y., Sun R., Hu H., Liu Y., Herrmann M., et al. Receptor-Mediated NETosis on Neutrophils. *Front Immunol* 2021; 12: 775267.
  75. Vorobjeva N.V., Chernyak B.V. NETosis: Molecular Mechanisms, Role in Physiology and Pathology. *Biochemistry (Mosc)* 2020; 85: 1178–90. DOI: 10.1134/S0006297920100065
  76. Klopff J., Brostjan C., Eilenberg W., Neumayer C. Neutrophil Extracellular Traps and Their Implications in Cardiovascular and Inflammatory Disease. *Int J Mol Sci* 2021; 22: 559. DOI: 10.3390/ijms22020559
  77. von Köckritz-Blickwede M., Winstel V. Molecular Prerequisites for Neutrophil Extracellular Trap Formation and Evasion Mechanisms of *Staphylococcus Aureus*. *Front Immunol* 2022; 13: 836278.
  78. Yipp B.G., Kubes P. NETosis: How Vital Is It? *Blood* 2013; 122: 2784–94. DOI: 10.1182/blood-2013-04-457671
  79. Pilsczek F.H., Salina D., Poon K.K.H., Fahey C., Yipp B.G., Sibley C.D., et al. A Novel Mechanism of Rapid Nuclear Neutrophil Extracellular Trap Formation in Response to *Staphylococcus Aureus*. *J Immunol* 2010; 185: 7413–25. DOI: 10.4049/jimmunol.1000675
  80. Martinod K., Demers M., Fuchs T.A., Wong S.L., Brill A., Gallant M., et al. Neutrophil Histone Modification by Peptidylarginine Deiminase 4 Is Critical for Deep Vein Thrombosis in Mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 8674–9. DOI: 10.1073/pnas.1301059110