

В.О. Бицадзе¹, Е.В. Слуханчук², Д.Х. Хизроева¹,
М.В. Третьякова^{1, 3}, А.С. Шкода⁴, Л.С. Радецкая¹,
А.Д. Макацария¹, И. Элалами^{1, 5}, Ж.-К. Грис^{1, 6}, Э. Грандоне^{1, 7}



¹ Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Российская Федерация

² Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского, Москва, Российская Федерация

³ ООО «Лечебный Центр», Москва, Российская Федерация

⁴ Городская клиническая больница № 67 им. Л.А. Ворохобова, Москва, Российская Федерация

⁵ Медицинский университет Сорбонна; Университетский госпиталь Тенон, Париж, Франция

⁶ Университет Монпелье, Монпелье, Франция

⁷ Научно-исследовательская больница Casa Sollievo della Sofferenza, отделение тромбоза и гемостаза, Сан-Джованни-Ротондо, Фоджа, Италия

Внеклеточные ловушки нейтрофилов (NETs) в патогенезе тромбоза и тромбовоспалительных заболеваний

В статье обобщены многочисленные исследования о взаимосвязи таких биологических процессов, как воспаление и тромбообразование. Продемонстрирована огромная роль нейтрофилов и выделяемых ими внеклеточных ловушек нейтрофилов (neutrophil extracellular traps, NETs). Открытие NETs расширило горизонты в понимании биологии нейтрофилов и роли этих клеток в организме. Использование хроматина в сочетании с внутриклеточными белками в качестве противомикробного средства имеет древнюю историю и меняет наше представление о хроматине только как о носителе генетической информации. Благодаря NETs нейтрофилы могут способствовать развитию патологического венозного и артериального тромбоза, или «иммунотромбоза», а также атеросклероза. Высвобождение NETs является, как было показано, одной из причин тромбообразования при таких состояниях, как сепсис и рак. Наличие NETs при этих заболеваниях и состояниях дает возможность использовать их или отдельные компоненты как потенциальные биомаркеры. NETs и их компоненты могут быть привлекательны в качестве терапевтических мишеней. Дальнейшие исследования нейтрофилов и NETs необходимы для разработки новых подходов к диагностике и лечению воспалительных и тромботических состояний. Возможно, давно забытые препараты найдут новую сферу для эффективного применения.

Ключевые слова: нейтрофилы, внеклеточные ловушки нейтрофилов (NETs), тромбоз, иммунотромбоз, нетоз (NETosis), рак-ассоциированные тромбозы

Для цитирования: Бицадзе В.О., Слуханчук Е.В., Хизроева Д.Х., Третьякова М.В., Шкода А.С., Радецкая Л.С., Макацария А.Д., Элалами И., Грис Ж.-К., Грандоне Э. Внеклеточные ловушки нейтрофилов (NETs) в патогенезе тромбоза и тромбовоспалительных заболеваний. *Вестник РАМН.* 2021;76(1):75–85. doi: <https://doi.org/10.15690/vramn1395>

Введение

Большое количество исследований за последние годы продемонстрировало тесную связь между процессами воспаления и тромбообразования [1]. Среди множества участников иммунного ответа в процессе воспалительной реакции нейтрофилы занимают одно из самых важных мест. Они первыми направляются в очаг воспаления в ответ на выделение сигнальных молекул поврежденными тканями. Выделяемые в ответ на повреждение или воспаление медиаторы, такие как хемокины (chemokines, от chemotactic cytokine) CXCL1 или CXCL2, связываются и активируют G-протеинсвязанные рецепторы на нейтрофилах. Дальнейшая реакция нейтрофилов многогранна, это и фагоцитоз, и продукция реактивных молекул кислорода, протеаз, и выброс нейтрофильных внеклеточных ловушек.

Связь нейтрофилов с тромбовоспалением впервые была выявлена 70 лет назад. Гранулоциты были описаны как основной компонент сгустков крови у пациентов с активной формой системной красной волчанки (СКВ). В последующие годы в ряде исследований было показано накопление нейтрофилов в участках формирования тромба, однако их вклад в развитие тромботических состояний

оставался не изучен. Ситуация изменилась в тот момент, когда выяснилось, что нейтрофилы являются первичным источником тканевого фактора (ТФ), основного активатора внешнего пути свертывания. Позже в лабораторных исследованиях была доказана большая роль нейтрофилов в развитии тромбоза и тромботических осложнений воспалительных процессов [2]. Исследования на мышах показали, что при венозных и артериальных тромбозах с самых ранних стадий формирования тромба происходят привлечение и активация нейтрофилов в участке повреждения сосудистой стенки [3]. Искусственно вызванная в исследованиях нейтропения препятствовала развитию как артериальных, так и венозных тромбозов.

NETs: определение понятия, основные характеристики

Исследования последних лет в области молекулярной биологии приоткрыли завесу наиболее интересного процесса в физиологии нейтрофилов, а именно выделения ими нейтрофильных внеклеточных ловушек (neutrophil extracellular traps, NETs). Нейтрофилы — наиболее распространенный вид лейкоцитов. Являясь важной состав-

ляющей иммунитета, они представляют собой первую линию защиты от инфицирования бактериями, грибами и простейшими. Фагоцитоз и секреция антимикробных веществ из гранул — не единственные функции нейтрофилов. В 2004 г. был открыт еще один механизм борьбы с микробной инвазией — формирование нейтрофильных внеклеточных ловушек. NETs представляют собой внеклеточные структуры, подобные сетям из нитей хроматина, высланных высокоактивными протеазами и белками ядерного, цитозольного и гранулярного происхождения. Выделение NETs активированными нейтрофилами было описано в 2004 г. как механизм, способный захватить и инактивировать большое количество патогенов. Этот процесс, как было позже показано, лежит в основе многочисленных неинфекционных воспалительных процессов, таких как СКВ, ревматоидный артрит (РА), аутоиммунный васкулит, язвенный колит, тромбоз и др. [4–6].

Процесс образования NETs, называемый NETosis (нетоз), может быть вызван различными индукторами: микроорганизмами, бактериальными компонентами, активированными тромбоцитами, комплементарными пептидами, аутоантителами, интерлейкинами (IL) IL-8 и т.д. После контакта индуктора с рецепторами на мембране клетки активируется молекулярный каскад, который приводит к выходу кальция из эндоплазматического ретикулума, что, в свою очередь, вызывает повышение активности цитоплазматической деиминазы PAD4 (protein arginine deiminases 4). Наряду с этим уменьшается конденсация хроматина.

Пептидил аргинин PAD4 представляет собой фермент, ответственный за гиперцитруллинацию гистонов в процессе нетоза. Через некоторое время нейтрофилы теряют гетерохроматические области ядра, в результате чего ядра расширяются и становятся круглыми. Ядерная оболочка распадается на везикулы, мембраны гранул,

и митохондрий разрушаются, что приводит к смешению цитоплазмы, кариоплазмы и антибактериальных пептидов. Белки гранул адсорбируются на отрицательно заряженных фибриллах деконденсированного хроматина, который служит скелетом для ловушки. В итоге клеточная мембрана разрывается и содержимое клетки выбрасывается наружу и разворачивается в пространстве, образуя сеть [7]. V. Brinkmann et al. [7] показали, что выделяемые в составе NETs структуры представлены нитями ДНК, сплетенными в сети с гистонами, эластазой, миелопероксидазой (myeloperoxidase, МРО) и катепсином G. Известно, что нейтрофилы могут продуцировать NETs, выделяя часть ядра или ядро целиком (suicidal NETosis, суицидальный нетоз), и не нарушать целостность клеточной мембраны. Такой механизм получил название «прижизненный, или витальный, нетоз» (vital NETosis). Эти две формы одного и того же процесса имеют существенные различия. Во-первых, суицидальный нетоз вызывается в основном химической стимуляцией гранулоцитов и требует несколько часов для продукции NETs, в то время как прижизненный нетоз активируется при раздражении нейтрофилов бактериальными агентами и занимает меньшее время. Во-вторых, витальный нетоз не приводит к лизированию клетки, и она сохраняет способность к хемотаксису и фагоцитозу. Третье отличие заключается в механизме выпуска ловушек. Как было описано выше, при суицидальном нетозе происходят деконденсация хроматина, растворение ядерной оболочки и выброс содержимого клетки через перфорацию в плазматической мембране. Во время прижизненного нетоза происходит перенос дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из ядра во внеклеточное пространство с помощью везикул. Везикулы с ДНК, отделившиеся от ядра, проходят через цитоплазму и сливаются с клеточной мембраной, тем самым выбрасывая NETs из клетки без перфорации мембраны.

76

V.O. Bitsadze¹, E.V. Slukhanchuk², J.Kh. Khizroeva¹, M.V. Tretyakova^{1, 3}, A.S. Shkoda⁴, L.S. Radetskaya¹, A.D. Makatsariya¹, I. Elalamy^{1, 5}, J.-C. Gris^{1, 6}, E. Grandone^{1, 7}

¹ The First I.M. Sechenov Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

² Petrovsky National Research Center of Surgery, Moscow, Russian Federation

³ “Medical Center” LLC, Moscow, Russian Federation

⁴ L.A. Vorokhobov City Clinical Hospital No. 67, Moscow, Russian Federation

⁵ Department of Thrombosis Center, Tenon University Hospital; Medicine Sorbonne University, Paris, France

⁶ University Montpellier, Montpellier, France

⁷ Thrombosis and Haemostasis Research Unit, Fondazione I.R.C.C.S. “Casa Sollievo della Sofferenza”, San Giovanni Rotondo, FG, Italy

Extracellular Neutrophil Traps (NETs) in the Pathogenesis of Thrombosis and Thromboinflammation

This article summarizes numerous studies on the relationship of biological processes such as inflammation and thrombosis. The huge role of neutrophils and the extracellular neutrophil traps (NETs) secreted by them has been demonstrated. The discovery of NETs has opened new horizons in the understanding of neutrophil biology and the role of these cells in the body. The use of chromatin in combination with the intracellular proteins, as an effective antimicrobial agent has ancient roots and changes our understanding of chromatin only as a carrier of genetic information. Through NETs, neutrophils can contribute to the development of pathological venous and arterial thrombosis or “immunothrombosis”, as well as atherosclerosis. NETs release has been shown to be one of the causes of thrombosis in conditions such as sepsis and cancer. The presence of NETs in these diseases and conditions makes it possible to use them or individual components as potential biomarkers. NETs and their components may be attractive as therapeutic targets. Further studies of neutrophils and NETs are needed to develop new approaches to the diagnosis and treatment of inflammatory and thrombotic conditions. Perhaps long-forgotten drugs will find a new area for effective use.

Keywords: neutrophils, extracellular neutrophil traps (NETs), immunothrombosis thrombosis, NETosis, cancer-associated thrombosis

For citation: Bitsadze VO, Slukhanchuk EV, Khizroeva JKh, Tretyakova MV, Shkoda AS, Radetskaya LS, Makatsariya AD, Elalamy I, Gris J-C, Grandone E. Extracellular Neutrophil Traps (NETs) in the Pathogenesis of Thrombosis and Thromboinflammation. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2021;76(1):75–85. doi: <https://doi.org/10.15690/vramn1395>

Ряд исследователей полагают, что NETs, образованные при прижизненном нетозе, состоят из митохондриальной ДНК и не содержат гистонов, основного клеточного токсина. NETs начинают определяться уже через 30 мин от начала воздействия патологического агента.

Суицидальный нетоз

Стимуляция нейтрофилов приводит к активации никотинамидадениндинуклеотидфосфата-Н (НАДФН) на их поверхности, активации PKC и Raf–MEK–ERK-сигнальных путей и последующей генерации активных форм кислорода. Активированная PAD4 и гиперцитрулиновые гистоны приводят к деконденсации хроматина. На этом фоне MPO и эластаза нейтрофилов (neutrophil elastase, NE) выделяются из азурофильных гранул. В состав будущих NETs входит 24 белка. NE разрушает актиновые филаменты цитоплазмы, транслоцирует ядро и воздействует на гистоны. Далее происходит протеолитическое разрушение ядерной оболочки, выделение хроматина в цитоплазму и смешивание его с плазматическими белками. Недавно был выявлен новый фактор, обуславливающий пирозитоз в макрофагах, — гасдермин D (gasdermin D, GSDMD). NE ферментативно активирует его до формирования активной формы GSDMD-NT, способной формировать поры на поверхности клеточной мембраны и мембран гранул, способствуя тем самым выбросу NETs. Суицидальный нетоз занимает от 3 до 4 ч [8].

Пути запуска выброса NETs зависят от агента, стимулирующего нейтрофилы. Одни запускающие агенты (некоторые бактерии, вирусы и т.д.) используют преимущественно путь НАДФН-оксидазы, другие действуют через MPO и PAD4, третьи — через NE и цитрулинизацию гистонов (рис. 1).

Витальный нетоз

NETs способны формироваться крайне быстро в результате процесса под названием «витальный нетоз», который в настоящий момент недостаточно изучен. Длительность витального нетоза составляет от 5 до 60 мин. При сепсисе витальный нетоз осуществляется за счет TLR4-активации тромбоцитов и их связывания с ней-

трофилами. При витальном нетозе не участвует НАДФН и нейтрофил сохраняет способность к миграции и фагоцитозу. Потеря содержимого ядра в секретируемых везикулах не приводит к утрате способности к фагоцитозу и выделению цитотоксичных молекул. Также так и его ближайшие родственники эритроциты и тромбоциты, нейтрофил, лишившись ядра, получает название «цитопласт» и продолжает выполнять ряд функций (рис. 2).

Известно, что не все, а лишь 20–25% нейтрофилов способны генерировать NETs. Максимальное количество NETs производят так называемые нейтрофилы низкой плотности. Активированные тромбоциты инициируют мощный выброс NETs нейтрофилами, обеспечивая тем самым создание каркаса для отложения фибрина и стабилизации тромба [9]. Попадая в участок повреждения, NETs привлекают с собой ряд белков, а также факторы свертывания, участвующие в тромбообразовании, такие как фактор Виллебранда (ФВ), XII фактор, фибриноген и фибронектин. Кроме того, NETs способны индуцировать активацию эндотелия, активацию и агрегацию тромбоцитов и генерацию тромбина.

Филогенетически способность NETs активировать свертываемость была необходима для захвата и выведения патогенов, обеспечивая существование примитивных организмов миллионы лет назад, сейчас она присутствует у насекомых. У данной группы организмов свертываемость и иммунный ответ служат для защиты от потери крови и инвазии патогенов. Две системы связаны между собой: так, NET-ассоциированные противомикробные протеазы способны активировать несколько путей свертывания, а активация системы свертывания осуществляется за счет участников иммунных реакций. Возможно, большинство NET-ассоциированных антибактериальных эффектов связано больше с захватом и иммобилизацией, чем непосредственно с гибелью клетки.

Помимо нейтрофилов внеклеточные ловушки могут формировать и другие гранулоциты, например эозинофилы и тучные клетки [10]. Недавние исследования показали, что при формировании атеросклеротической бляшки и тромбозе макрофаги, тучные клетки и эозинофилы способны выделять внеклеточные ловушки [11, 12]. Таким

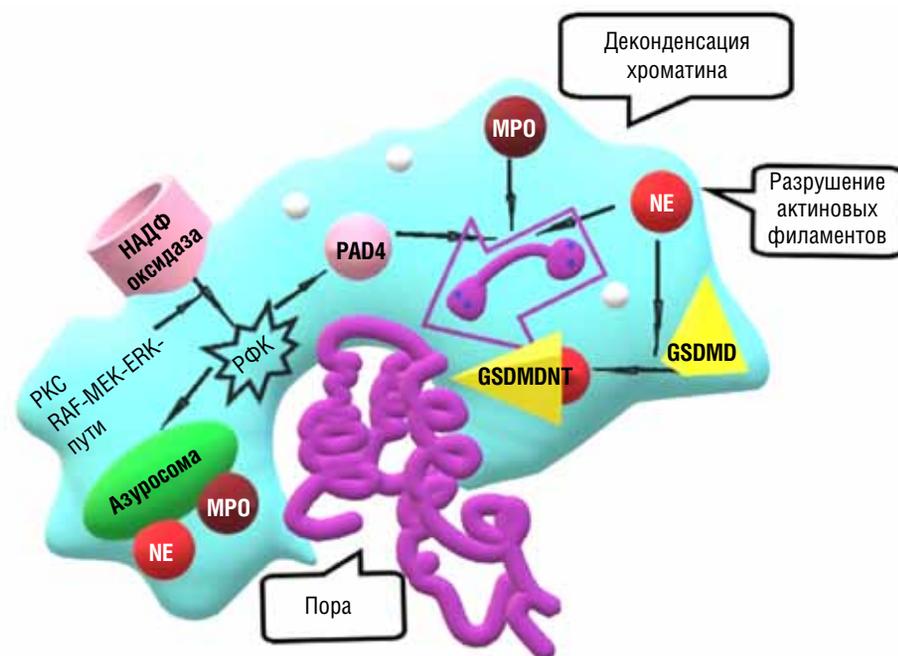


Рис. 1. Суицидальный нетоз

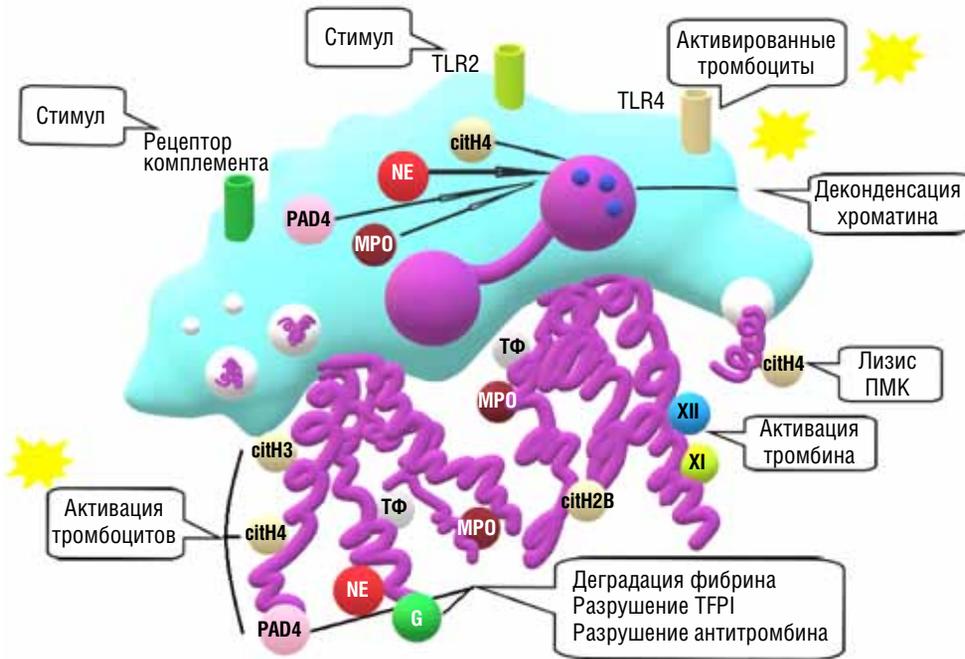


Рис. 2. Витальный нетоз

78

образом, NETs на сегодняшний день рассматриваются как новые кандидаты для диагностики и терапии тромбоза различной этиологии [2, 4, 13].

Регулирует выработку NETs ряд независимых факторов как микробного, так и неинфекционного происхождения, такие как цитокины, хемокины, иммунные комплексы, кристаллические и неорганические полифосфаты (polyP) или амфотерин (high mobility group box B1, HMGB1), выделяемые активированными тромбоцитами [8, 14]. Стимулы от различных активаторов могут суммироваться. Таким образом, для стимуляции выработки NETs тромбоцитами необходима синхронная стимуляция нейтрофилов выделяемыми из тромбоцитов хемокинами CXCL4 и CCL5, а также интегрином Mac-1. Чрезмерная непропорциональная выработка NETs может приводить к повреждению ткани. Регуляторными механизмами являются противовоспалительные механизмы, такие как разрушение NETs с помощью ДНКазы 1 и ДНКазы 1-подобной 3, также фагоцитоз остатков NETs макрофагами [6]. Противовоспалительный эффект самих NETs осуществляется за счет протеолитической модуляции цитокиновой и хемокиновой активности протеазами, которые выделяют агрегированные NETs.

NETs в патогенезе тромбоза

Прокоагулянтная активность ДНК доказана множеством исследований. ДНК, входящая в состав NETs, попадая в плазму крови, является триггером генерации тромбина независимо от тканевого фактора. Контактная активация приводит к формированию активного фактора XIIa, последующей активации фактора XI и генерации тромбина. ДНК нарушает процессы фибринолиза путем формирования устойчивых комплексов с тромбином и фибрином, тем самым препятствуя плазмин-опосредованной деградации фибрина. Ряд исследований продемонстрировал влияние внеклеточной ДНК на гемостаз (табл. 1).

Механизм влияния гистонов на гемостаз многокомпонентный. Гистоны способствуют агрегации тромбоцитов,

генерации тромбина в богатой тромбоцитами плазме в отсутствие тканевого фактора или тромбомодулина. Они запускают выброс тромбоцитами неорганических полифосфатов, экспозицию мембран-связанного фосфатидилсерина, вызывают активацию V фактора, тем самым увеличивая активность протромбиназного комплекса. Гистоны вмешиваются в тромбомодулин-опосредованную активацию протеина C, приводя к синтезу тромбина в бедной тромбоцитами плазме в присутствии тромбомодулина. Наибольшим прокоагулянтным эффектом обладают гистоны H3 и H4 (табл. 2).

В эксперименте на мышах вслед за повреждением и активацией эндотелия происходили привлечение нейтрофилов и запуск тромбоцитарных реакций путем формирования NETs и доставки активированного тканевого фактора и протеаз нейтрофилов, таких как нейтрофильная эластаза (Neutrophil elastase, NE) и катепсин G (CG) [18]. У мышей с генетическими дефектами и отсутствием NE и CG повреждение сонной артерии приводило к меньшему формированию фибрина, образованию более мелких и нестабильных тромбов и, как следствие, их более быстрой реканализации, возможно, в связи с поврежденным ТФ путем ингибитора деградации из NETs связанных NE и CG. Внеклеточные гистоны, необходимый компонент NETs, также усугубляют ишемическое повреждение на мышечных моделях с временной окклюзией и реперфузией средней церебральной артерии. Их введение в фазу реперфузии приводит к крупным инфарктам. Эффект от этого воздействия значительно снижается при введении гистон-нейтрализующих антител или рекомбинантной человеческой ДНКазы 1. Аналогичные изменения выявлены при повреждении миокарда. Лигирование и реперфузия левой передней нисходящей артерии у крыс с последующим введением ДНКазы 1 и рекомбинантного тканевого активатора плазминогена (tissue plasminogen activator, tPA), снижало ишемическое повреждение, улучшало отдаленные последствия работы сердечной мышцы по сравнению с контрольной группой либо без введения компонентов, либо с введением одного из них.

Таблица 1. Влияние внеклеточной ДНК на свертываемость

Авторы исследования	Методы исследования	Результаты исследования
Kannemeier et al., 2007	Тромбоэластография. Время свертывания. Хромогенные методы	ДНК укорачивает время свертывания цельной крови и плазмы, активирует фактор XII и усиливает тромбин-зависимую генерацию фактора XIa
Swystun et al., 2011; Bhagirath et al., 2015	Генерация тромбина в бедной тромбоцитами плазме	Внеклеточная ДНК усиливает генерацию тромбина в плазме крови
Vu et al., 2015	Время свертывания. Генерация тромбина в бедной тромбоцитами плазме. Активация фактора XII, тромбин-зависимая генерация фактора XIa	ДНК укорачивает время свертывания, повышает генерацию тромбина в плазме крови, способствует активации фактора XII и генерации фактора XIa
Kokoye et al., 2016	Генерация тромбина в бедной тромбоцитами плазме. Оценка активации фактора XII и прекалликреина	ДНК увеличивает концентрацию фактора XII и активацию прекалликреина, усиливает генерацию тромбина
Ncoubouossie et al., 2017	ELISA для определения FXIa–C1INH-комплексов. Хромогенные методы определения генерации фактора XI. Генерация тромбина в бедной и богатой тромбоцитами плазме	Внеклеточная ДНК способствует контактной активации свертывания и генерации тромбина в бедной и богатой тромбоцитами плазме. ДНК активирует фактор XII и усиливает тромбин-зависимую генерацию фактора XIa. ДНК усиливает опосредованную тканевым фактором генерацию тромбина
Ivanov et al., 2017	Хромогенные исследования прекалликреина и активации фактора XI. Генерация тромбина в плазме	В присутствии высокомолекулярного кининогена ДНК способствует активации прекалликреина и фактора XI. ДНК повышает генерацию тромбина независимо от тканевого фактора, усиливает опосредованную тканевым фактором генерацию тромбина

Таблица 2. Влияние гистонов на систему гемостаза

Авторы исследования	Результаты исследования
Kheiri et al., 1996	Удлинение протромбинового времени, АЧТВ, времени свертывания при добавлении яда гадюки Рассела, но не тромбинового времени
Fuchs et al., 2011	Повышение агрегации тромбоцитов. Тромбоцитопения, удлинение времени свертывания
Semeraro et al., 2016	Усиление генерации тромбина в бедной тромбоцитами плазме. Повышение агрегации тромбоцитов, экспрессия фосфатидилсерина. Повышение протромбиназной активности на тромбоцитах, FV/FVa
Ammollo et al., 2011	Повышение генерации тромбина в присутствии тромбомодулина. H1-ослабление генерации тромбина в бедной тромбоцитами плазме. Снижение тромбин-тромбомодулин-опосредованной активации протеина С
Abrams et al., 2013	Развития тромбоза в легких и почках. Повышение концентрации комплексов тромбин–антитромбин
Barranco-Medina et al., 2013	H4 — запуск перехода протромбина в тромбин
Semeraro et al., 2014	H4 — усиление экспрессии фосфатидилсерина на эритроцитах
Yang et al., 2016	Усиление влияния тканевого фактора на эндотелиальные клетки и макрофаги
Kim et al., 2016	Усиление влияния тканевого фактора на эндотелиальные клетки и снижение влияния тромбомодулина на эндотелий
Gould et al., 2016	Повышение экспрессии тканевого фактора и экспозиции фосфатидилсерина моноцитами и THP-1-клетками
Noubouossie et al., 2017	Повышение генерации тромбина в богатой тромбоцитами плазме
Kordbacheh et al., 2017	Повышение агрегации эритроцитов, разрушение и лизис эритроцитов. Тромбоцитопения, анемия, лейкопения

В моделях экспериментального атеросклероза у мышей было показано, что внеклеточный гистон H4, полученный из NETs, запускает лизис гладкомышечных клеток (ГМК), приводя к дестабилизации бляшки, в то время как нейтрализация гистона H4 препятствует гибели ГМК и стабилизирует участки атеросклероза [19] (см. рис. 1).

Помимо влияния на структуры тромба и его стабилизацию, внеклеточная ДНК и NETs также принимают участие в процессах лизиса тромба. В эксперименте на моделях обезьян было показано, что искусственное снижение лейкоцитарной инфильтрации при тромбозе глубоких вен приводило к нестабильности тромба. NETs непосредственно запускают деградацию фибрина посредством NETs-связанных NE и CG, в то время как гистон H2B выступает в роли рецептора для плазминогена, привлекая плазминоген из плазмы крови. Нейтрализация NETs-зависимых протеаз антипротеазами плазмы *in vivo* приводила к снижению влияния NETs на лизис тромба. Добавление ДНК и гистонов к плазме вело к утолщению нитей фибрина. Было показано, что у пациентов с инфарктом миокарда со спонтанным лизисом тромба в тромбах отсутствовали несущие NETs нейтрофилы и сами NETs. Все эти исследования свидетельствуют о том, что NETs необходимы для стабилизации тромба и защиты его от лизиса. В табл. 3 представлены данные, полученные при изучении прокоагулянтной активности NETs *ex vivo*.

Атеротромбоз

NETs способствуют поддержанию воспалительного процесса и прогрессированию атеросклероза. Доказано, что концентрация NETs повышена у пациентов с сахарным диабетом. Процесс заживления ран у этих пациентов нарушен. У больных сахарным диабетом также нарушаются процессы резорбции атеросклеротических бляшек. В экспериментах на мышах искусственное сдерживание нетоза приводило к уменьшению размеров атеросклеротических бляшек, снижению выраженности воспалительных реакций в стенках сосудов [21].

Атеротромбоз у человека запускается выраженной активацией тромбоцитов, следующей за эрозией или разрывом атеросклеротической бляшки и обнажением тромбогенного материала в просвет сосуда. Сформировавшийся, богатый тромбоцитами тромб укрепляется за счет активации коагуляционного каскада тканевым фактором. Миелопероксидазы, внеклеточная ДНК, а также ком-

плексы МРО–ДНК как маркеры формирования NETs выявляются в участках кровоизлияния в атеросклеротических бляшках каротидных артерий, а также во внутрипросветных тромбах пациентов с аневризмами брюшного отдела аорты.

Нейтрофилы и NETs вовлекаются в тромбоз коронарных артерий в результате активации эндотелия, эрозии атеросклеротической бляшки или разрыва ее [11]. Нейтрофилы и NETs всегда присутствуют в составе тромбов пациентов с инфарктом миокарда с подъемом ST (STEMI) и тромбированными стентами. NETs в составе коронарных тромбов экспрессируют IL-17A/F и ТФ, активирующие тромбоциты и коагуляционный каскад. Несущие ТФ NETs привлекаются полифосфатами, которые секретируют активированные тромбином тромбоциты, в то время как IL-29/интерферон λ1 ослабляет формирование NETs путем блокирования пути полифосфаты–mTOR–аутофаги (mammalian target of rapamycin — мишень рапамицина млекопитающих) [9]. В присутствии NETs отмечено формирование прочных коронарных тромбов, поддерживающих ишемию, с более высокими ферментативными показателями и размерами области инфаркта у 111 пациентов с STEMI. В проспективном перекрестном исследовании 282 пациентов с ишемической болезнью сердца плазменные маркеры формирования NETs, такие как цитрулиновый гистон H4 (citH4) и комплексы МРО и ДНК, повышались при увеличении концентрации комплексов тромбин–антитромбин и уровней ФВ, сочетаясь с нарастанием частоты острого коронарного синдрома и коронарной смерти в медиану длительности наблюдения 545 дней.

Значительное повышение концентрации ДНК, нуклеосом и цитрулированного гистона H3 (citH3) как маркеров объема присутствующих NETs отмечено также и у пациентов с инсультом [22]. У пациентов с острым ишемическим инсультом количество маркеров формирования NETs повышалось с ростом стабильности тромба и его резистентности к эндovasкулярной терапии [23], тяжести нарушений мозгового кровообращения и смертности от всех причин в течение года [24].

Массивная агрегация тромбоцитов совсем не обязательна для венозного тромбоза. Низкоскоростной венозный тромбоз запускается активацией эндотелия, связанной со стазом крови, быстрым привлечением нейтрофилов и адгезией посредством эндотелиального Р-селектина. Как нейтрофилы, так и Nets выявляются в больших количествах в венозных тромбах у мышей

Таблица 3. Прокоагулянтная активность NETs *ex vivo*

Авторы исследования	Методы исследования	Результаты исследования
Oemcke et al., 2009	Хромогенная оценка гидролиза прекалликреина в плазме	NETs связывают XII и высокомолекулярный кининоген, способствуют гидролизу прекалликреина в плазме крови
Fuchs et al., 2010	Электронная и флюоресцентная микроскопия	NETs связываются с тромбоцитами, способствуют их активации и агрегации. NETs связываются с эритроцитами, фактором Виллебранда, фибриногеном и фибронектином. NETs обеспечивают появление резистентности к tPA-опосредованному фибринолизу
Gould et al., 2014	Тест генерации тромбина с бедной и богатой тромбоцитами плазме	NETs усиливают генерацию тромбина
Ivanov et al., 2017	Тест генерации тромбина в плазме	NETs укорачивает время начала генерации тромбина
Wang et al., 2018	Тест генерации тромбина в плазме	NETs формируют комплексы с микровезикулами, усиливая тем самым генерацию тромбина в плазме

с индуцированным окклюзионным тромбозом нижней полой вены. Адгезированные нейтрофилы взаимодействуют с тромбоцитами и начинают выставлять тромбогенные элементы, такие как ТФ и фактор XII, с помощью NETs. Было выявлено повышение концентрации маркеров формирования NETs в экспериментальных моделях тромбоза подвздошной вены у обезьян (внеклеточная ДНК) и человека (циркулирующие нуклеосомы и NE/ α 1-антитрипсин-комплексы). В исследовании «случай–контроль» с участием 345 пациентов было показано, что при повышении концентрации маркеров синтеза NETs дозозависимо, до трех раз, повышается риск тромбоза глубоких вен, при исключении известных факторов риска, таких как онкологические заболевания, курение, иммобилизация, госпитализация.

Хроническая тромбэмболическая легочная гипертензия

Хроническая тромбэмболическая легочная гипертензия (chronic thromboembolic pulmonary hypertension, СТЕРН) характеризуется персистенцией и резистентностью к лизису легочных эмболов, что приводит к хронической обструкции легочных артерий и артериопатии мелких ветвей. Возможно, именно присутствие NETs и ДНК приводит к стабилизации тромбов, и инфильтрация NETs легочных тромбов делает их резистентными к лизису, а следовательно, к их персистенции. В исследовании с участием пациентов со СТЕРН было показано, что концентрация МРО в их плазме крови в 10 раз, NE — в 7 раз, комплексов МРО/ДНК — в 2 раза выше, чем в контрольной группе. Более того, в результате анализа организованных тромбов, полученных при эндартерэктомии у этих пациентов, выявлены большие количества CitH3-позитивных клеток, протеинаргининдеиминазы 4 (PAD4), NET-содержащих нейтрофилов, комплексов МРО/ДНК и NETs.

NETs в патогенезе рак-ассоциированных тромбозов

За последние годы множество исследований, проведенных на экспериментальных моделях опухолей, а также у пациентов с онкологическими заболеваниями, показало значительный вклад NETs в развитие рак-ассоциированных венозных и артериальных тромбозов, а также влияние на рост опухоли и ее метастазирование [25]. Привлечение нейтрофилов в премеазиатический участок опухоли играет критическую роль в запуске процесса метастазирования [26].

Á. Teijeira et al. в своем исследовании продемонстрировали, как опухолевые клетки меняют работу нейтрофилов и способствуют выработке ими NETs. NETs, в свою очередь, окутывают опухолевые клетки, делая их недоступными для Т- и NK-клеток [27]. Авторы указывают, что именно хемокины, секретируемые опухолевыми клетками, стимулируют нетоз нейтрофилов человека. Модель была продемонстрирована на примере хемокиновых рецепторов CXCR1 и CXCR2. Ингибиторы данных рецепторов, такие как репариксин и токсин коклюша, или блокирующие антитела к рецептору CXCR1 препятствуют развитию нетоза. Для оценки взаимодействий авторы использовали опухолевые клетки толстой кишки. Опухолевые клетки вызывали нетоз, который подавлялся при введении репариксина. При добавлении NK-клеток опухолевые клетки в присутствии NETs демонстрировали

большую выживаемость, чем те, которые были ранее обработаны ДНКазой с целью удаления с их поверхности NETs.

Защитные функции NETs в отношении опухолевой ткани были продемонстрированы *in vivo* у мышей с метастазами рака молочной железы, которым проводилась терапия ДНКазой или PAD4 ингибиторами GSK484 (ингибиторами нетоза), на фоне чего отмечалось снижение числа микрометастазов. Однако терапия была неэффективна у мышей, у которых отсутствовали Т- и NK-клетки, что свидетельствует о том, что NETs защищают опухолевые клетки именно от них. В дальнейших исследованиях было показано, что NETs уменьшают физический контакт между опухолевыми клетками и цитотоксичными лимфоцитами.

L.-Y. Yang et al. в своем исследовании [28] продемонстрировали сочетание гепатоцеллюлярной карциномы с повышенным содержанием NETs, особенно при метастатических формах заболевания. Было показано, что NETs окутывают клетки гепатоцеллюлярной карциномы, далее обеспечивают выживаемость опухолевых клеток и повышают их инвазивный потенциал для метастазирования. Это происходит через внедрение NETs в захваченные клетки опухоли и активацию Toll-подобных рецепторов TLR4/9-COX2. При блокировке этих рецепторов влияние NETs нивелируется. Комбинация ДНКазы, непосредственно разрушающей NETs, с противовоспалительными препаратами аспирином или гидроксихлорином, как было показано, эффективно снижала метастазирование гепатоцеллюлярной карциномы у мышей.

Онкологический процесс характеризуется накоплением нейтрофилов в развивающейся опухоли и повышением риска тромбоза. Тромбоз при раке является основной причиной смерти [29]. Demers et al. на различных животных моделях показали, что повышение количества нейтрофилов и выработка ими NETs повышают риск венозных тромбозов в опухолевых тканях. Этот процесс имеет системный характер и запускается опухолевым гранулоцит-колониаль-стимулирующим фактором и другими составляющими микросреду опухоли, такими как IL-8 и экзосомы [30].

Внутри опухоли ТФ, связанный с NETs, запускает процессы тромбоза и некроза опухоли, а также может активировать неоангиогенез, обеспечивая метаболическую поддержку быстро растущим опухолевым клеткам. Более того, опухолевые NETs, являясь источником ТФ, могут запускать и системные тромбозы. Опухолевые клетки повышают агрегацию тромбоцитов, стимулируя синтез ФВ эндотелием, который сам по себе способен связываться к NETs, способствуя тромбозу [30]. В одном из исследований было показано, что рак-ассоциированный тромбоз запускался нейтрофилами низкой плотности, генерируемыми формированием NETs при участии комплемента. Проспективное наблюдательное исследование, в которое вошли 1000 пациентов с впервые выявленным раком и пациенты с прогрессией после ремиссии, показало, что уровни CitH3 и выраженность формирования NETs были независимыми биомаркерами развития венозного тромбоземболизма (ВТЭ) [13].

NETs в патогенезе синдрома системного воспалительного ответа

Активация нейтрофилов в процессе воспалительной реакции может приводить к избыточному синтезу

и выбросу NETs с последующим повреждением клеток эндотелия и развитием полиорганной недостаточности. Острый респираторный дистресс-синдром характеризуется массивными воспалительными повреждениями ткани легких. Было показано, что именно избыточный выброс NETs является основой патогенеза. Эту гипотезу подтверждает тот факт, что при дефиците PAD4 и при терапии ДНКазой выраженность поражений легких на фоне воспаления значительно снижается, однако полное подавление выработки NETs при ингибировании PAD4 способствует распространению инфекции. Наиболее токсичны в отношении эндотелия сосудов и эпителия легких гистоны NETs. При этом в отношении гистонов, связанных с сосудистой стенкой ФВ, ДНКазы не проявляет значительной активности. NETs также способствуют развитию фиброза легочной ткани при длительном воспалительном процессе.

У септических пациентов сформированные NETs несут функционально активный ТФ. Следствием этого являются высокая частота диссеминированного внутрисосудистого свертывания, повышенный риск ВТЭ, а также дефекты фибринолиза у пациентов с сепсисом [31, 32].

NETs в патогенезе тромбовоспалительных заболеваний

Известно, что формирование NETs способствует развитию аутоиммунных реакций [5]. Повышенная частота развития тромботических осложнений у пациентов с системными воспалительными заболеваниями, особенно в периоды обострения, может быть объяснена в том числе и NET-зависимой активацией системы свертывания [2, 33, 34].

Ключевая роль NETs в патогенезе тромбоза при аутоиммунных состояниях впервые была продемонстрирована при васкулитах (antineutrophil cytoplasmic antibodies associated vasculitis, AAV) на фоне циркуляции антинейтрофил-цитоплазматических антител (anti-neutrophil cytoplasmic antibodies, ANCA) [35]. У пациентов, умерших от данного состояния, при аутопсии в легочных и венозных тромбах было выявлено большое количество NETs. У страдающих этим заболеванием пациентов также были выделены нейтрофилы, выделяющие NETs со связанным ТФ как в циркулирующей крови, так и в лаваже бронхоальвеолярного дерева, в биоптатах слизистой носа и почек. Более того, *in vitro* стимуляция нейтрофилов сывороткой крови или ANCA, полученными от таких пациентов, стимулировала выработку ТФ в нейтрофилах и его выход вне клетки при помощи NETs. Интересный факт: ремиссия заболевания или снижение концентрации ANCA уменьшали выраженность этих эффектов, таким образом, имеет смысл говорить о патогенетической роли ANCA в развитии ААВ. Связанный с NETs тромбогенный ТФ также был выявлен в периферической крови и биоптатах пораженных тканей у пациентов с СКВ в стадии обострения и у больных с язвенными колитами [36, 37].

Прошло 13 лет с тех пор, как было показано, что иммуноглобулин G, полученный от пациентов с антифосфолипидным синдромом, способен запускать экспрессию ТФ нейтрофилами человека. По последним экспериментальным и клиническим данным формирование NETs и регуляция их выработки представляют собой новый патогенетический механизм развития таких тромботических аутоиммунных состояний, как антифосфолипидный синдром, гепарин-индуцированная тромбоцитопениче-

ская пурпура, еще раз подтверждая важнейшую роль нейтрофилов в иммунотромбозе [38–40].

Помимо тканевого фактора, в активации свертывания при клиническом обострении аутоиммунных воспалительных заболеваний значимое участие принимают гистоны и другие производные нейтрофилов и NETs, такие как фосфатидилсерин-положительные микрочастицы (MPs) или аутоантигены. В последнее время активно изучаются взаимодействия тромбоцитов и нейтрофилов в процессе повреждения сосудистой стенки. HMGB1 на тромбоцитарных MPs являются основными активаторами аутофаг-опосредованного выделения NETs у пациентов с системной склеродермией, что означает вовлеченность нейтрофильных аутофагов и NETs в процессы повреждения сосудистой стенки и микротромбозы [41].

Помимо протромботического действия, NETs содействуют развитию эндотелиальной дисфункции и формированию атеросклеротических бляшек [42]. Формирование NETs выступает связующим звеном между процессами воспаления и атеротромбоза у пациентов с хроническими ревматическими заболеваниями, такими как СКВ и РА [43, 44]. Было показано, что подавление синтеза NETs при использовании ингибитора PAD4 у мышей с СКВ значительно улучшало ситуацию с эндотелиальной дисфункцией и снижало риск тромбозов. У пациентов с РА было повышено содержание в плазме крови антител к гистонам.

Многочисленные субстанции, производимые нейтрофилами, являются точками приложения исследований, направленных на разработку новых терапевтических стратегий сложных аутоиммунных тромбовоспалительных заболеваний [45–47]. Анализ РНК-секвенирования цельной крови пациентов с ААВ показал, что число гранулоцитов низкой плотности (low-density granulocytes, LDGs), способных продуцировать большое количество NETs, связано со степенью активности заболевания и резистентностью к терапии. Следовательно, в ситуациях с повышенной концентрацией LDGs пациенту требуется более агрессивная терапия. Транскриптомный анализ нейтрофилов показал, что молекула адгезии Р-селектин гликопротеин лиганд-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1, PSGL-1) может являться потенциальной терапевтической мишенью при первичном антифосфолипидном синдроме (АФС). У мышей с дефицитом PSGL-1, как оказалось, снижено образование NETs [46].

Анализом геномного метилирования ДНК нейтрофилов было показано, что у пациентов с первичным АФС и СКВ различны индивидуальные профили метилирования ДНК [47]. Связана ли эта гетерогенность с различиями в выработке NETs и будет ли это влиять на подходы в терапии различных форм АФС, покажут будущие исследования.

Новые мишени в терапии тромбозов и тромбовоспалительных заболеваний с учетом патогенетического действия NETs

По результатам многочисленных исследований выявлены следующие группы возможных мишеней для новой терапии [9, 48–54] (рис. 3).

Недавнее исследование CANTOS (Canakinumab Anti-Inflammatory Thrombosis Outcome Study) показало, что противовоспалительная терапия, направленная на IL-1 β , значительно снижала риск сердечно-сосудистых

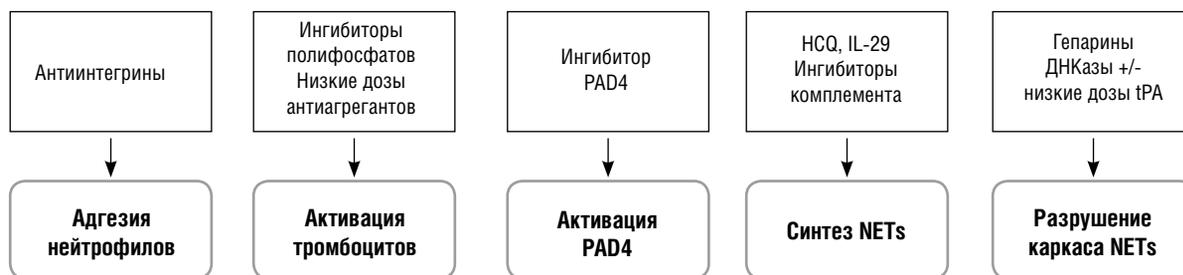


Рис. 3. Возможные мишени для терапии тромбовоспалительных заболеваний, опосредованных нейтрофилами и NETs

Примечание. HCQ — гидроксихлорохин; IL-29 — интерлейкин-29; PAD4 — протеин аргинин деиминаза-4; tPA — тканевой активатор плазминогена.

осложнений у пациентов с предшествующим инфарктом миокарда без влияния на уровень липидов крови. IL-1 β , как было установлено, влияет на процессы аутофагии и снижает интенсивность формирования NETs и их активность [9, 36, 37, 41, 51, 55]. В исследовании HIBISCUS была оценена эффективность гидроксихлорохина во вторичной профилактике тромботических осложнений при первичном АФС [50]. Было продемонстрировано, что HCQ блокирует процессы формирования NETs и аутофагии.

Заключение

Тромбовоспаление и иммунотромбоз постепенно становятся все более изученными. Перспективным кажется определение нетоза и его выраженности как биомаркера у пациентов с тромбовоспалительными заболеваниями. Замедление или предотвращение нетоза может явиться новой стратегией противотромботической терапии. Заблокировав выброс ядерного материала и, как следствие, контактную активацию гемостаза, появится возможность избежать риск кровотечений как осложнения этой терапии. Дальнейшие исследования нейтрофилов и NETs необходимы для разработки новых подходов

к диагностике и лечению воспалительных и тромботических состояний. Возможно, давно забытые препараты найдут новую сферу для эффективного применения [2, 13, 24, 51, 56].

Дополнительная информация

Источник финансирования. Работа проведена за счет бюджетных средств организации.

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

Участие авторов. В.О. Бицадзе, А.Д. Макацария, И. Элалами, Ж.-К. Грис, Э. Грандоне — анализ и экспертная оценка информации статьи; Е.В. Слуханчук — поиск публикаций по теме статьи, системное изложение данных о внеклеточных ловушках нейтрофилов, систематизация и финальное редактирование обзора; Д.Х. Хизроева — поиск публикаций по теме статьи, системное изложение данных о внеклеточных ловушках нейтрофилов; М.В. Третьякова, А.С. Шкода, Л.С. Радецкая — поиск публикаций по теме статьи. Все авторы внесли существенный вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

ЛИТЕРАТУРА

- Burzynski LC, Humphry M, Pyriouk K, et al. The coagulation and immune systems are directly linked through the activation of interleukin-1 α by thrombin. *Immunity*. 2019;50:1033–1042. doi: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.003>
- Bonaventura A, Montecucco F, Dallegri F, et al. Novel findings in neutrophil biology and their impact on cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*. 2019;115:1266–1285. doi: <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz084>
- Bonaventura A, Vecchié A, Abbate A, Montecucco F. Neutrophil extracellular traps and cardiovascular diseases: an update. *Cells*. 2020;9:231. doi: <https://doi.org/10.3390/cells9010231>
- Mitsios A, Arampatzioglou A, Arelaki S, et al. NETopathies? Unraveling the dark side of old diseases through neutrophils. *Front Immunol*. 2017;7:678. doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00678>
- Jorch SK, Kubers P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat Med*. 2017;23:279. doi: <https://doi.org/10.1038/nm.4294>
- Jiménez-Alcázar M, Rangaswamy C, Panda R, et al. Host DNases prevent vascular occlusion by neutrophil extracellular traps. *Science*. 2017;358:1202–1206. doi: <https://doi.org/10.1126/science.aam8897>
- Brinkmann V. Neutrophil extracellular traps in the second decade. *J Innate Immun*. 2018;10(5-6):414–421. doi: <https://doi.org/10.1159/000489829>
- Chen KW, Monteleone M, Boucher D, et al. Noncanonical inflammasome signaling elicits gasdermin D-dependent neutrophil extracellular traps. *Sci Immunol*. 2018;3(26):eaar6676. doi: <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aar6676>
- Chrysanthopoulou A, Kambas K, Stakos D, et al. Interferon lambda1/IL-29 and inorganic polyphosphate are novel regulators of neutrophil-driven thromboinflammation. *J Pathol*. 2017;243(1):111–122. doi: <https://doi.org/10.1002/path.4935>
- von Köckritz-Blickwede M, Goldmann O, Thulin P, et al. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. *Blood*. 2008;111:3070–3080. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-104018>
- Pertiwi KR, de Boer OJ, Mackaaij C, et al. Extracellular traps derived from macrophages, mast cells, eosinophils and neutrophils are generated in a time-dependent manner during atherothrombosis. *J Pathol*. 2019;247(4):505–512. doi: <https://doi.org/10.1002/path.5212>
- Marx C, Novotny J, Salbeck D, Zellner KR, Nicolai L, Pekayvaz K, et al. Eosinophil-platelet interactions promote atherosclerosis and stabilize thrombosis with eosinophil extracellular traps. *Blood*. 2019;134:1859–1872. doi: <https://doi.org/10.1182/blood.2019000518>
- Grilz E, Mauracher LM, Posch F, et al. Citrullinated histone H3, a biomarker for neutrophil extracellular trap formation, pre-

- dicts the risk of mortality in patients with cancer. *Br J Haematol.* 2019;186:311–320. doi: <https://doi.org/10.1111/bjh.15906>
14. Sollberger G, Tilley DO, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: the biology of chromatin externalization. *Dev Cell.* 2018;44:542–553. doi: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.01.019>
 15. Noubouossie DF, Whelihan MF, Yu Y-B, et al. *In vitro* activation of coagulation by human neutrophil DNA and histone proteins but not neutrophil extracellular traps. *Blood.* 2017;129:1021–1029. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2016-06-722298>
 16. Ivanov I, Shakhawat R, Sun M-F, et al. Nucleic acids as cofactors for factor XI and prekallikrein activation: Different roles for high-molecular-weight kininogen. *Thromb Haemost.* 2017;117(4):671–681. doi: <https://doi.org/10.1160/TH16-09-0691>
 17. Kordbacheh F, O'Meara CH, Coupland LA, et al. Extracellular histones induce erythrocyte fragility and anemia. *Blood.* 2017;130:2884–2888. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2017-06-790519>
 18. Okeke EB, Louttit C, Fry C, et al. Inhibition of neutrophil elastase prevents neutrophil extracellular trap formation and rescues mice from endotoxic shock. *Biomaterials.* 2020;238:119836. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.119836>
 19. Silvestre-Roig C, Braster Q, Wichapong K, et al. Externalized histone H4 orchestrates chronic inflammation by inducing lytic cell death. *Nature.* 2019;569:236–240. doi: <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1167-6>
 20. Wang Y, Luo L, Braun OÖ, et al. Neutrophil extracellular trap-microparticle complexes enhance thrombin generation via the intrinsic pathway of coagulation in mice. *Sci Rep.* 2018;8:1–14. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22156-5>
 21. Josefs T, Barrett TJ, Brown EJ, et al. Neutrophil extracellular traps promote macrophage inflammation and impair atherosclerosis resolution in diabetic mice. *JCI Insight.* 2020;5. doi: <https://doi.org/10.1172/jci.insight.134796>
 22. Ashar HK, Mueller NC, Rudd JM, et al. The Role of Extracellular Histones in Influenza Virus Pathogenesis. *Am J Pathol.* 2018;188:135–148. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.09.014>
 23. Ducroux C, Di Meglio L, Loyau S, et al. Thrombus neutrophil extracellular traps content impair tPA-induced thrombolysis in acute ischemic stroke. *Stroke.* 2018;49:754–757. doi: <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.117.019896>
 24. Vallés J, Lago A, Santos MT, et al. Neutrophil extracellular traps are increased in patients with acute ischemic stroke: prognostic significance. *Thromb Haemost.* 2017;117:1919–1929. doi: <https://doi.org/10.1160/TH17-02-0130>
 25. Wolach O, Sellar RS, Martinod K, et al. Increased neutrophil extracellular trap formation promotes thrombosis in myeloproliferative neoplasms. *Science Translational Medicine.* 2018;10:eaan8292. doi: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aan8292>
 26. Schedel F, Mayer-Hain S, Pappelbaum KI, et al. Evidence and impact of neutrophil extracellular traps in malignant melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2020;33(1):63–73. doi: <https://doi.org/10.1111/pcmr.12818>
 27. Teijeira Á, Garasa S, Gato M, et al. Cxcr1 and cxcr2 chemokine receptor agonists produced by tumors induce neutrophil extracellular traps that interfere with immune cytotoxicity. *Immunity.* 2020;52(5):856–871.e8. doi: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.03.001>
 28. Yang L-Y, Luo Q, Lu L, et al. Increased neutrophil extracellular traps promote metastasis potential of hepatocellular carcinoma via provoking tumorous inflammatory response. *J Hematol Oncol.* 2020;13:1–15. doi: <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0836-0>
 29. White C, Noble SI, Watson M, et al. Prevalence, symptom burden, and natural history of deep vein thrombosis in people with advanced cancer in specialist palliative care units (HIDDEN): a prospective longitudinal observational study. *Lancet Haematol.* 2019;6:e79–e88. doi: [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(18\)30215-1](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(18)30215-1)
 30. Demers M, Krause DS, Schatzberg D, et al. Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. *Proc Natl Acad Sci.* 2012;109(32):13076–13081. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1200419109>
 31. Yang S, Qi H, Kan K, et al. Neutrophil extracellular traps promote hypercoagulability in patients with sepsis. *Shock.* 2017;47(2):132–139. doi: <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000741>
 32. Delabranche X, Stiel L, Severac F, et al. Evidence of netosis in septic shock-induced disseminated intravascular coagulation. *Shock.* 2017;47(3):313–317. doi: <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000719>
 33. Kapoor S, Opneja A, Nayak L. The role of neutrophils in thrombosis. *Thromb Res.* 2018;170:87–96. doi: <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2018.08.005>
 34. Duvvuri B, Pachman LM, Morgan G, et al. Neutrophil Extracellular Traps in Tissue and Periphery in Juvenile Dermatomyositis. *Arthritis Rheumatol.* 2020;72(2):348–358. doi: <https://doi.org/10.1002/art.41078>
 35. Goel RR, Kaplan MJ. Deadliest catch: neutrophil extracellular traps in autoimmunity. *Curr Op Rheumatol.* 2020;32:64–70. doi: <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000667>
 36. Angelidou I, Chrysanthopoulou A, Mitsios A, et al. REDD1/autophagy pathway is associated with neutrophil-driven IL-1β inflammatory response in active ulcerative colitis. *J Immunol.* 2018;200:3950–3961. doi: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701643>
 37. Frangou E, Chrysanthopoulou A, Mitsios A, et al. REDD1/autophagy pathway promotes thromboinflammation and fibrosis in human systemic lupus erythematosus (SLE) through NETs decorated with tissue factor (TF) and interleukin-17A (IL-17A). *Ann Rheum Dis.* 2019;78:238–248. doi: <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-213181>
 38. Meng H, Yalavarthi S, Kanthi Y, et al. *In vivo* role of neutrophil extracellular traps in antiphospholipid antibody-mediated venous thrombosis. *Arthritis Rheumatol.* 2017;69(3):655–667. doi: <https://doi.org/10.1002/art.39938>
 39. Gollomp K, Kim M, Johnston I, et al. Neutrophil accumulation and NET release contribute to thrombosis in HIT. *JCI Insight.* 2018;3(18):e99445. doi: <https://doi.org/10.1172/jci.insight.99445>
 40. Perdomo J, Leung HH, Ahmadi Z, et al. Neutrophil activation and NETosis are the major drivers of thrombosis in heparin-induced thrombocytopenia. *Nat Commun.* 2019;10:1–14. doi: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09160-7>
 41. Maugeri N, Capobianco A, Rovere-Querini P, et al. Platelet microparticles sustain autophagy-associated activation of neutrophils in systemic sclerosis. *Sci Transl Med.* 2018;10:eaao3089. doi: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aao3089>
 42. Qi H, Yang S, Zhang L. Neutrophil extracellular traps and endothelial dysfunction in atherosclerosis and thrombosis. *Front Immunol.* 2017;8:928. doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00928>
 43. Wiseman SJ, Ralston SH, Wardlaw JM. Cerebrovascular disease in rheumatic diseases: a systematic review and meta-analysis. *Stroke.* 2016;47:943–950. doi: <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.115.012052>
 44. Agca R, Heslinga S, Rollefstad S, et al. EULAR recommendations for cardiovascular disease risk management in patients with rheumatoid arthritis and other forms of inflammatory joint disorders: 2015/2016 update. *Ann Rheum Dis.* 2017;76(1):17–28. doi: <http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-209775>
 45. Ali RA, Gandhi AA, Meng H, et al. Adenosine receptor agonism protects against NETosis and thrombosis in antiphospholipid syndrome. *Nature Commun.* 2019;10:1–12. doi: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09801-x>
 46. Knight JS, Meng H, Coit P, et al. Activated signature of antiphospholipid syndrome neutrophils reveals potential therapeutic target. *JCI Insight.* 2017;2(18):e93897. doi: <https://doi.org/10.1172/jci.insight.93897>
 47. Weeding E, Coit P, Yalavarthi S, et al. Genome-wide DNA methylation analysis in primary antiphospholipid syndrome neutrophils. *Clin Immunol.* 2018;196:110–116. doi: <https://doi.org/10.1016/j.clim.2018.11.011>

48. Sharma A, McCann K, Tripathi JK, et al. Tamoxifen restores extracellular trap formation in neutrophils from patients with chronic granulomatous disease in a reactive oxygen species-independent manner. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;144(2):597–600.e593. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.04.014>
49. Papagoras C, Chrysanthopoulou A, Mitsios A, et al. Autophagy inhibition in adult-onset Still's disease: still more space for hydroxychloroquine? *Clin Exp Rheumatol*. 2017;35 Suppl 108 (6):133–134.
50. Belizna C, Pregnotato F, Abad S, et al. HIBISCUS: Hydroxychloroquine for the secondary prevention of thrombotic and obstetrical events in primary antiphospholipid syndrome. *Autoimmunity Reviews*. 2018;17:1153–1168. doi: <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2018.05.012>
51. Manfredi AA, Rovere-Querini P, D'Angelo A, Maugeri N. Low molecular weight heparins prevent the induction of autophagy of activated neutrophils and the formation of neutrophil extracellular traps. *Pharmacol Res*. 2017;123:146–156. doi: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.08.008>
52. Van Avondt K, Maegdefessel L, Soehnlein O. Therapeutic targeting of neutrophil extracellular traps in atherogenic inflammation. *Thromb Haemost*. 2019;119(4):542–552. doi: <https://doi.org/10.1055/s-0039-1678664>
53. Mastellos DC, Reis ES, Ricklin D, et al. Complement C3-targeted therapy: replacing long-held assertions with evidence-based discovery. *Trends Immunol*. 2017;38(6):383–394. doi: <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.03.003>
54. Boone BA, Murthy P, Miller-Ocuin J, Doerfler WR, Ellis JT, Liang X, et al. Chloroquine reduces hypercoagulability in pancreatic cancer through inhibition of neutrophil extracellular traps. *BMC Cancer*. 2018;18:678. doi: <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4584-2>
55. Skendros P, Chrysanthopoulou A, Rousset F, et al. Regulated in development and DNA damage responses 1 (REDD1) links stress with IL-1 β -mediated familial Mediterranean fever attack through autophagy-driven neutrophil extracellular traps. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;140(5):1378–1387.e1313. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.02.021>
56. Mauracher LM, Posch F, Martinod K, et al. Citrullinated histone H3, a biomarker of neutrophil extracellular trap formation, predicts the risk of venous thromboembolism in cancer patients. *J Thromb Haemost*. 2018;16(3):508–518. doi: <https://doi.org/10.1111/jth.13951>

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Бицадзе Виктория Омаровна, д.м.н., профессор [*Victoria O. Bitsadze*, MD, PhD, Professor];
адрес: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8-2 [address: 8-2 Trubetskaya str., 119991, Moscow, Russia];
e-mail: vikabits@mail.ru, SPIN-код: 5930-0859, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8404-1042>

Слуханчук Екатерина Викторовна, к.м.н., доцент [*Ekaterina V. Slukhanchuk*, MD, PhD, Assistant Professor];
e-mail: beloborodova@rambler.ru, SPIN-код: 7423-8944, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7441-2778>

Хизроева Джамия Хизриевна, д.м.н., профессор [*Jamilya H. Khizroeva*, MD, PhD, Professor];
e-mail: jamatotu@gmail.com, SPIN-код: 8225-4976, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0725-9686>

Третьякова Мария Владимировна, к.м.н., доцент [*Maria V. Tretyakova*, MD, PhD, Assistant Professor];
e-mail: tretyakova777@yandex.ru, SPIN-код: 1463-0065, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3628-0804>

Шкода Андрей Сергеевич, д.м.н., профессор [*Andrei S. Shkoda*, MD, PhD, Professor]; e-mail: a.shkoda@67gkb.ru,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9783-1796>

Радецкая Людмила Сергеевна, к.м.н., доцент [*S. Liudmila Radetskaya*, MD, Associated Professor];
e-mail: udaeva@gmail.com, SPIN-код: 4554-7324, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3410-6885>

Макацария Александр Давидович, д.м.н., академик РАН [*Alexander D. Makatsariya*, MD, PhD, Academician of the RAS]; e-mail: gemostasis@mail.ru, SPIN-код: 7538-2966, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7415-4633>

Элалами Исмаил, д.м.н., профессор [*Ismail Elalamy*, MD, PhD, Professor]; e-mail: ismail.elalamy@aphp.fr,
Scopus Author ID: 7003652413, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9576-1368>

Грис Жан-Кристоф, д.м.н., профессор [*Jean-Christophe Gris*, MD, PhD, Professor];
e-mail: jean.christophe.gris@chu-nimes.fr, Scopus Author ID: 7005114260, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9899-9910>

Грандоне Эльвира, д.м.н., профессор [*Elvira Grandone*, MD, PhD, Professor]; e-mail: grandoneelvira@gmail.com,
Scopus Author ID: 7006391091, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8980-9783>