


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ЧИТИНСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

 На правах рукописи

Паршина Анастасия Анатольевна

**ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ РОЛЬ НЕТОЗА В КОАГУЛЯЦИИ
ПЛАЗМЫ И ФИБРИНОЛИЗЕ ПРИ РАКЕ ТОЛСТОГО
КИШЕЧНИКА (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-КЛИНИЧЕСКОЕ
ИССЛЕДОВАНИЕ)**

14.03.03 – патологическая физиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор Н.Н. Цыбиков

Чита – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	9
1.1. Нейтрофилы: современные представления о структуре и функциях.....	9
1.2. Структура и функции нейтрофильных внеклеточных ловушек.....	12
1.3. Внутриклеточные механизмы формирования нейтрофильных внеклеточных ловушек, их стимуляторы и ингибиторы.....	15
1.4. Нейтрофильные внеклеточные ловушки в патогенезе инфекционных и неинфекционных заболеваний.....	19
1.4.1. Нейтрофильные внеклеточные ловушки в системе гемостаза.....	24
1.4.2. Нейтрофильные внеклеточные ловушки при онкопатологии.....	30
1.5. Заключение.....	32
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	34
2.1. Дизайн исследования.....	34
2.2. Предварительный этап исследования.....	36
2.2.1. Исследование особенностей фибринообразования.....	36
2.2.2. Исследование фибринолитических свойств интактных и активированных нейтрофильных гранулоцитов методом фибриновых пластин (ФП) по Аструпу.....	39
2.2.3. Исследование концентрации тканевого фактора и нейтрофильной эластазы.....	40
2.3. Основной этап исследования.....	40
2.3.1. Флюоресцентная микроскопия нейтрофильных внеклеточных ловушек.....	42
2.3.2. Измерение уровня внеклеточной ДНК.....	42
2.3.3. Исследование особенностей фибринообразования и фибринолиза.....	42
2.3.4. Измерение концентрации некоторых компонентов плазмы крови, участвующих в процессах тромбообразования и фибринолиза.....	43

2.3.5. Измерение уровня микровезикул, несущих тканевой фактор МР-CD142+.....	43
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	45
3.1. Результаты предварительного этапа исследования.....	45
3.1.1. Результаты предварительного этапа исследования в группе контроля	45
Исследование тромбодинамики в группе контроля.....	45
Результаты измерения количества тканевого фактора и нейтрофильной эластазы в группе контроля.....	47
Результаты измерения фибринолитической активности в группе контроля...	47
3.1.2. Результаты предварительного этапа в группе пациентов.....	52
Исследование тромбодинамики в группе пациентов.....	52
Результаты измерения количества тканевого фактора и нейтрофильной эластазы в группе пациентов.....	48
Результаты измерения фибринолитической активности в группе пациентов	50
3.2. Результаты основного этапа исследования.....	52
3.2.1. Измерение уровня внеклеточной ДНК.....	52
3.2.2. Визуализация нейтрофильных внеклеточных ловушек.....	53
3.2.3. Исследование фибринообразования и фибринолиза.....	57
3.2.4. Результаты корреляционного анализа.....	68
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	72
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	84
ВЫВОДЫ.....	87
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	89
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	111

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень её разработанности

Нейтрофильные гранулоциты (НГ), самые многочисленные лейкоциты периферической крови, считались хорошо изученными клетками с известным строением и функциями, до момента открытия нового явления – нетоза (от англ. NETosis, NETs – neutrophil extracellular traps), или гибели НГ с формированием нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) [133]. Достаточно быстро было установлено, что данное явление не является уникальным и специфичным для одного или узкой группы патологических процессов, но напротив, признаки его встречаются при разнородных заболеваниях. НГ как представители врожденного иммунитета являются участниками всех воспалительных процессов в организме человека независимо от их этиологии и локализации [82]. Известно также, что лейкоциты участвуют в реакциях гемостаза и, закономерно, компоненты НВЛ обнаружены в составе артериальных и венозных тромбов и тромбоэмболов, в пораженной атеросклерозом или аутоиммунным воспалением сосудистой стенке. Учитывая, что воспаление и гиперкоагуляция имеют единый биологический смысл – локализация патогена и предотвращение его диссеминации, обнаружение НВЛ в составе тромбов ожидаемо и данный аспект взаимодействия нетоза и системы гемостаза является в значительной степени разработанным. Морфологические исследования выявили тесное взаимодействие главного субстрата НВЛ – внеклеточной ДНК (вкДНК) и гистоновых белков с прочими гуморальными и клеточными участниками тромбообразования – тромбоцитами, эритроцитами, микровезикулами, факторами свёртывания крови (ФСК) [63]. Термин иммунотромбоз стал ассоциирован с сообщениями об исследованиях НВЛ [80]. На фоне активного поиска признаков нетоза при патологии, сопровождающейся

гиперкоагуляцией (например, при атеросклерозе, тромбозе глубоких вен, аутоиммунных заболеваниях и т.п.) остались недостаточно освещенными вопросы влияния ДНК-сетей на систему фибринолиза, что, учитывая, практически одновременную со свертыванием крови его активацию, вероятно должно иметь и клинические последствия. Значительное количество работ описывает прокоагулянтный эффект, основанный на протеолитической модификации и как следствие инактивации специфических ингибиторов факторов свертывания (например TFPI) [112, 122, 155], однако не дают информации о возможности протеолиза и самих факторов свертывания, чего нельзя исключить. В целом, открытым остается вопрос о возможности избирательного накопления в НВЛ корпускулярных и молекулярных участников процессов фибринообразования и фибринолиза, учитывая морфологические особенности данной структуры. Особый интерес и самостоятельную область исследований представляет изучение процесса нетоза при наличии злокачественных новообразований, которые, во-первых, ассоциированы с состоянием хронической гиперкоагуляции, во-вторых – являются примером измененной иммунной реактивности и диссоциации лейкоцитов, в том числе НГ, на субпопуляции, демонстрирующими различные свойства [102, 162]. Разнообразие ситуаций, в которых потенциально возможно участие НВЛ, оправдывает и значительную вариативность моделей его исследования.

Цель исследования: установить патогенетическую роль литического нетоза в процессах свертывания плазмы крови и фибринолиза в норме и при состоянии хронической гиперкоагуляции у лиц с раком толстого кишечника.

Задачи исследования

1. Установить отличия в формировании нейтрофильных внеклеточных ловушек у доноров и пациентов со злокачественными новообразованиями толстого кишечника на основании плазменного уровня внеклеточной ДНК.
2. Выявить патогенетическую роль нейтрофильных внеклеточных ловушек в процессах коагуляции плазмы и последующего фибринолиза у доноров

и пациентов со злокачественными новообразованиями толстого кишечника.

3. Исследовать влияние нетоза на плазменный уровень тканевого фактора, микровезикул CD142+, фибриногена, протромбина, IX и XIII факторов свертывания крови, антитромбина-III в норме и у пациентов со злокачественными новообразованиями толстого кишечника.
4. Изучить влияние нетоза на уровень плазминогена/плазмина, tPA, PAI-1 в плазме крови доноров и лиц со злокачественными новообразованиями толстого кишечника.
5. Установить влияние литического нетоза в *in vitro* модели на уровень ИЛ-6, ИЛ-8, P-селектина, PSGL-1 в норме и у пациентов со злокачественными новообразованиями толстого кишечника.

Научная новизна

Впервые установлено, что индукция нетоза с помощью фторбол-12-миристат-13-ацетата слабее у лиц, имеющих злокачественные новообразования толстого кишечника, в сравнении со здоровыми донорами.

Впервые показано, что формирование нейтрофильных внеклеточных ловушек в аутоплазме сопровождается задержкой начального этапа коагуляции.

Впервые выявлено, что формирование нейтрофильных внеклеточных ловушек в плазме крови сопровождается интенсификацией фибринолиза.

Впервые доказано, что формирование нейтрофильных внеклеточных ловушек у здоровых доноров ассоциировано с увеличением концентрации плазминогена/плазмина, ИЛ-8, PSGL-1 и уменьшением уровня PAI-1.

Теоретическая и практическая значимость

В работе выявлена роль нетогенеза в реализации механизмов свертывания крови и фибринолиза в норме и при патологических состояниях на примере злокачественных новообразований толстого кишечника. Установлены функциональные и количественные показатели, характеризующие процессы фибринообразования и фибринолиза, что позволяет выявить те их компоненты

и/или этапы, которые наиболее чувствительны к влиянию нетоза. Полученные результаты позволяют прогнозировать характер и динамику расстройств гемостаза при развитии патологического процесса.

Методология и методы исследования

Исследование представляет собой экспериментальную работу, выполненную *in vitro* на модели литического нетоза в аутоплазме. Изолированные НГ получены путем деления цельной венозной крови центрифугированием её на градиенте плотности фиколла-урографина. Индукция нетоза НГ выполнена с использованием активатора форбол-12-миристан-13-ацетата (ФМА), до совмещения плазмы и клеток. Совместная инкубация плазмы и клеток продолжалась 4 часа, после чего клетки и/или их остатки осаждались центрифугированием, плазма отбиралась для дальнейшего исследования. Методом регистрации пространственного роста фибринового сгустка (расширенный тест тромбодинамики) исследованы особенности фибринообразования и фибринолиза; методом проточной цитометрии были измерены концентрации компонентов систем коагуляции, антикоагулянтной и фибринолиза, а также содержание микровезикул, несущих тканевой фактор; методом ELISA были измерены содержание нейтрофильной эластазы, тканевого фактора и вкДНК; с использованием метода флуоресцентной микроскопии получены изображения НВЛ.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Индуцированная форбол-12-миристан-13-ацетатом генерация нейтрофильных внеклеточных ловушек у больных злокачественными новообразованиями толстого кишечника выражена слабее, чем у доноров.
2. Гибель нейтрофильных гранулоцитов путем литического нетоза, вызванного форбол-12-миристан-13-ацетатом, сопровождается ускорением начального этапа свертывания крови у лиц со злокачественными новообразованиями толстого кишечника и усилением фибринолиза – у доноров.

3. Формирование нейтрофильных внеклеточных ловушек ведет к локальному увеличению концентрации ИЛ-8 и PSGL-1, снижению – ИЛ-6 у доноров, и не влияет на их уровень у больных раком толстого кишечника.

Степень достоверности и апробация диссертации

Достоверность полученных результатов подтверждена воспроизводимостью результатов на предварительном и основном этапах исследования и при проверке соответствующими статистическими методами. Исследование одобрено на заседании локального этического комитета при ФГБУ ВО ЧГМА Минздрава России протокол №86 от 01.11.2017.

Результаты исследования доложены на XVII, XVIII, XIX межрегиональной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Медицина завтрашнего дня» (Чита, 2018-2020); Международной научно-практической конференции, посвященной 65-летию образования Читинской государственной медицинской академии «Актуальные проблемы клинической и экспериментальной медицины» (Чита, 2018).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ, в том числе 2 статьи в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки; 4 тезиса в сборниках российских и краевых научных конференций.

Внедрение в практику

Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс на кафедре патологической физиологии.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 113 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 18 таблицами и 9 рисунками.

ГЛАВА 1. Обзор литературы

В 2004 году группой исследователей из Института Макса Планка в Германии было впервые обнаружено и описано явление формирования нейтрофильными гранулоцитами внеклеточно расположенных сетеподобных структур, при воздействии на клетки естественными и искусственными активаторами [133]. Данное открытие привлекло внимание учёных, представляющих различные направления фундаментальной и прикладной науки. Последовавшие многочисленные экспериментальные работы позволили выявить иммунофенотипические особенности и особенности функционирования нейтрофилов, расширить представление об их патогенетическом влиянии на развитие воспалительных, в том числе неинфекционных, заболеваний. Явление гибели нейтрофилов с формированием экстрацеллюлярных сетей было признано новым механизмом генетически запрограммированной клеточной смерти и, одновременно, новым механизмом реализации врожденного иммунитета.

1.1. Нейтрофилы: современные представления о структуре и функциях

Нейтрофильные гранулоциты (НГ) представляют собой наиболее многочисленные клетки гранулоцитарного ростка кроветворения, основными функциями, которых является непосредственная реализация врожденного иммунитета (фагоцитоз, дегрануляции и формирования нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ, от англ. Neutrophils Extracellular Traps, NETs), а также регуляция адаптивного иммунного ответа и прочих межклеточных и гуморальных взаимодействий посредством синтеза и выделения широкого спектра про- и противовоспалительных цитокинов, протеаз, молекул адгезии, хемоаттрактантов и факторов роста [6, 8, 20, 22].

Согласно современным представлениям, НГ не являются гомогенным пулом узкоспециализированных клеток, а представлены разными по численности, продолжительности жизни, фенотипу и функциональной активности субпопуляциями [12, 21, 77, 112]. Данная особенность обеспечивает быстрый и дифференцированный ответ на любые изменения внутренней среды и делает нейтрофилы своеобразными сенсорами, чётко распознающими любой первичный сигнал, будь то инфекционные агенты, опухолевые клетки, травмы, изменения в свёртывающей системе крови, колебания баланса цитокинов, гормонов и пр. Выделение среди общего числа полиморфноядерных лейкоцитов (ПМЯЛ) отдельных популяций основано, главным образом, на разнице в экспрессии рецепторных структур, и следовательно их чувствительности к конкретным стимулам и активации соответствующих внутриклеточных сигнальных путей, что в конечном итоге определяет будут ли у данного пула клеток преобладать «классические» эффекторные цитотоксические свойства (мобильность, активный фагоцитоз, интенсивная продукция активных форм кислорода (АФК), протеаз и небольшая продолжительность жизни), или же их функция будет преимущественно регуляторная (увеличенная продолжительность жизни, продукция большего количества цитокинов: интерлейкины (ИЛ) 1, 8 и 10, фактор некроза опухолей α (TNF α), интерферон γ (IFN γ); фактора хемотаксиса моноцитов (CCL-2 и 3); фактора хемотаксиса нейтрофилов (CXCL-3 и 9); факторов роста; и в том числе формированию НВЛ). На данном принципе основано деление общего пула ПМЯЛ на такие варианты, как «aged» (старые) и «long living» (долго живущие); нейтрофилы высокой плотности (High Density Neutrophils, HDN и нейтрофилы низкой плотности (Low Density Neutrophils, LDN; на про- и противовоспалительные субпопуляции N1 и N2; на так называемые опухоль-ассоциированные нейтрофилы (tumor-associated neutrophils, TAN), среди которых также выделяются подварианты TAN1 и TAN2, обладающие соответственно противо- и проопухолевой активностью [77, 164]. При этом под влиянием внешних и/или внутренних сигналов исходный иммунофенотип клеток может меняться, адаптируясь под новые задачи [77, 161]. Таким образом в настоящее время нет

единого мнения относительно существования «нормального» базового соотношения тех или субпопуляций НГ, а также уникальных комбинаций их специфических антигенных детерминант, по которым можно было бы с уверенностью судить об иммунном статусе индивидуума. Данное направление представляется перспективным в плане выявления новых физиологических механизмов поддержания гомеостаза, оценки таких фундаментальных параметров, как индивидуальная реактивность и резистентность, а также склонности к инфекционным и многим неинфекционным заболеваниям (онкопатология, аутоиммунные болезни, коагулопатии и вазопатии с воспалительным компонентом, хронические воспалительные процессы различных органов и т.п.). Открытие феномена НВЛ [133] заставило пересмотреть механизмы развития многих патологических процессов и взглянуть на НГ как на интегральное звено, объединяющее иммунную систему и систему свёртывания крови, в единый комплекс, функционально направленный на реализацию фундаментальной защитной стратегии.

Для поддержания широкого спектра неспецифических функций нейтрофилы располагают богатым рецепторным аппаратом и экспрессируют на своей поверхности молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС) I и II классов, позволяющие им выступать в роли антигенпрезентирующих клеток (АПК); молекулы адгезии: CD62L, CD162, CD18, CD11a, CD11d; рецепторы для селектинов (PSGL-1) и интегринов (CD50 и CD54); FcR-рецепторы: CD16 (FcγRIII), CD32 (FcγRII), CD64 (FcγRI), CD89 (FcαRI), FcεR; рецепторы для компонентов комплемента: CD35, CD11b, CD11c, C5aR, C3aR, C5L2; рецепторы для связывания с антигеном: CD14, CD15, CD17, Pattern Recognition Receptors (PRR): Toll-like receptor (TLR) 1,2,4-10); рецепторы апоптоза: CD95; специфический активационный маркер: CD25 (рецептор для ИЛ-2). Также в арсенале НГ есть рецепторы для прочих цитокинов, гормонов, эндогенных пептидов, внеклеточной ДНК и РНК, ассоциированных с повреждением молекулярных паттернов (DAMP) и т.д. [13]. Часть антигенных маркеров экспрессируется на поверхности мембраны постоянно, другие же запасаются в составе специфических, желатиновых гранул

и секреторных везикул, и появление их свидетельствует о праймировании и активации клеток [2]. Кроме указанных молекул в гранулярном аппарате хранятся многочисленные протеазы и регуляторные пептиды; нейтрофилы синтезируют АФК, метаболиты азота и липидов, обладающие цитотоксическим действием [6, 23]. При активации НГ мигрируют в патологический очаг, где большая их часть реализует «классическую» защитную программу, представленную фагоцитозом и релизингом цитолитических компонентов, после чего гибнет путём апоптоза или некроза. Меньшие по численности субпопуляции перестраиваются на синтез регуляторных молекул, и вероятно, формируют НВЛ, биологические эффекты которых, кроме прямого воздействия на патоген (как в случае внедрения инфекционных агентов), могут варьировать в зависимости от локализации и выраженности процесса, что лежит в основе современных представлений о механизмах развития разного рода заболеваний (аутоиммунных, онкологических, васкулитов, сахарного диабета, тромбоза глубоких вен, атеросклероза, ишемической болезни сердца и т.д.). Однако в каждом из них присутствие НВЛ, являясь неспецифическим процессом, обуславливает наличие общих патогенетических звеньев таких как гиперкоагуляция, избыточная альтерация и, как следствие, хроническое воспаление.

1.2. Структура и функции нейтрофильных внеклеточных ловушек

Морфологически типичные НВЛ представлены волокнами ДНК толщиной около 15-17 нм, ассоциированными с глобулярными белковыми доменами диаметром 25-30 нм, состоящими из модифицированных гистоновых белков и ферментов цитоплазматических гранул нейтрофила-нейтрофильной эластазы (НЭ), миелопероксидазы (МПО), лактоферрина, лизоцима, коллагеназы, желатиназы, а также катепсина G, дефензинов и др. [5, 9]. Кроме характерных для нейтрофилов протеаз в состав «ловушек» включаются АФК и прочее содержимое цитоплазмы клеток, например белки цитоскелета – актин и миозин, антимикробный пептид кателицидин (LL-37), гликолитические ферменты α -енолаза и транскетолаза, а также белки группы S100. Несмотря на указанное

многообразие белковых молекул, около 70% от них представлено гистонами, а доминирующими ферментами являются МРО и НЭ [133, 142]. Выделяясь во внеклеточное пространство, комплекс вышеуказанных компонентов формирует обширную сетеподобную структуру, площадь которой, при наличии условий, может в 10-15 раз превышать размер клетки-источника, позволяя нейтрофилу атаковать крупные и/или многочисленные патогены [124, 147, 159]. Важно отметить, что вышеописанные НВЛ являются итогом фундаментальной реорганизации и дезинтеграции всех субклеточных структур, деконденсации хроматина и гомогенизации его с цитозольными компонентами, а выделение их – нетоз (от англ. NETosis), ассоциировано с разрушением цитоплазматической мембраны и гибелью клетки – suicide netosis («смертельный», литический нетоз) [46, 144]. Альтернативным вариантом процесса является vital netosis (прижизненный нетоз) – формирование сетей, путём экзоцитоза комплекса ДНК, гистоновых белков и протеаз нейтрофила, при этом сохраняются целостность цитоплазматической мембраны и внутриклеточная организация НГ. В составе сформированной ловушки отсутствуют белки цитоскелета и прочие цитоплазматические компоненты, встречающиеся при «смертельном» нетозе, а клетка ещё некоторое время остается живой, функционально активной и способной к фагоцитозу [142, 147, 166]. Причина того, почему клетка запускает прижизненный или литический путь остаётся неизвестной. На молекулярном уровне происходит ингибирование системы каспаз, что делает недоступным путь «классического» апоптоза. При этом нетоз необходимо рассматривать не столько как механизм смерти, но в большей степени как механизм киллинга, т.е. реализации ПМЯЛ их защитной программы [57]. Кроме вариаций самого процесса формирования, отличаться НВЛ могут и соотношением отдельных компонентов: наличием ядерной и/или митохондриальной ДНК, цитруллированных или нецитруллированных гистоновых белков, АФК [61, 83]. На вопрос о происхождении ДНК в «ловушках» ряд исследователей заявляют о бесспорно ядерном её происхождении [57, 147], другие же – о митохондриальном [37, 113, 177]. Накопленные на сегодняшний день данные, отражают не противоречия в

понимании механизмов нетоза, но скорее являются показателем его вариативности и четкой зависимости от стимулятора, его природы, времени воздействия и других условий. Таким образом конечные данные будут напрямую зависеть от конкретного протокола исследования. Отсутствие единого алгоритма и/или строгих стандартов, ведет к получению противоречивых результатов, но в то же время, позволяет раскрыть многие грани изучаемого явления, которые, по принципу перехода количества в качество, могут способствовать выявлению ранее скрытых закономерностей. Однако, очевидным и независимым от протоколов является факт того, что феномен НВЛ, представляет собой филогенетически древний защитный механизм, обнаруживаемый не только у человека, но даже у растений. Не вызывают сомнений и наличие микробицидных свойств ДНК и гистонов, и явная способность “ловушки” иммобилизовать патоген [31, 84, 108, 114, 147]. Есть основания предположить, что на ранних этапах эволюции многоклеточных организмов, в отсутствие специальных оборонительных систем, защита от агрессора, вероятно, могла осуществляться только путём формирования подобной ДНК-сети, клеткой или клетками подвергшимся атаке извне и они, “принося себя в жертву”, сохраняли жизнь целостного (многоклеточного) организма. Дальнейшее усложнение организации живых систем привело к выделению из общей массы клеток тех, что лучше прочих справляются с функцией защиты (исследования последних лет выявили способность к формированию ДНК-сетей [77] *in vitro* у эозинофилов [177], тучных клеток [115, 149], моноцитов [70], тканевых макрофагов [37] и у Т- и В-лимфоцитов [170]). В связи с чем НВЛ можно рассматривать, как, вероятно древнейший среди эукариот, защитный механизм. Таким образом феномен внеклеточных “ловушек”, который изначально вызывал множество вопросов по поводу его биологической целесообразности, в контексте эволюционной теории, представляется вполне логичным. Вместе с развитием организмов в целом, увеличением их количества и многообразия, эволюционировали и механизмы реализации данного способа уничтожения агрессора (раздражителя), без изменения его сути, что позволяет нам объяснить наличие в составе НВЛ не только ядерной, но и митохондриальной ДНК

(митохондрии превратились в субклеточные структуры уже на этапе эукариот), различные способы её выделения, широкий спектр неспецифических индукторов нетоза, а также факт того, что сейчас в организме человека циркулирующая внеклеточная ДНК сигнализирует об опасности и мобилизует иммунную систему.

1.3. Внутриклеточные механизмы формирования нейтрофильных внеклеточных ловушек, их стимуляторы и ингибиторы

Очевидно, что при большой площади поражения и агрессивном составе, формирование НВЛ на данном этапе эволюции представляется наиболее целесообразным в контексте противоинфекционного иммунитета, однако данный феномен не является специфичным для случаев внедрения микроорганизмов, и способностью побуждать клетки к формированию “ловушек” обладают многочисленные экзогенные и эндогенные агенты такие как: липополисахарид (ЛПС) [159] и фрагменты мембран бактерий [129, 144], грибы [85, 127], вирусные частицы [132, 138], патоген-ассоциированные молекулярные фрагменты (pathogen-associated molecular patterns, PAMP), DAMP [48, 57], иммуноглобулины и иммунные комплексы [87, 122, 139], компоненты системы комплемента [81, 176], ИЛ-8 и TNF [57, 118], факторы роста, кристаллы мочевой кислоты [115], колебания уровня глюкозы крови [57]; формируются НВЛ и в процессе межклеточных взаимодействий [56, 93, 117, 170] например с тромбоцитами [151], эндотелиоцитами [32], раковыми клетками [81], натуральными киллерами [117]. Однако, стимуляторы могут быть созданы искусственно. Так нефизиологическими индуктором является активатор протеинкиназы С (Proteinkinase C, PKC) – форбол-12-миристат-13-ацетат (ФМА) в оригинальном исследовании 2004 года [133], а также кальций-ионофоры – иономицин и A23187 [57, 106]. Стоит отметить, что ФМА на сегодняшний день остается одним из наиболее применяемых индукторов нетоза в исследованиях *in vitro*. Действие активаторов может быть реализовано и через соответствующие им рецепторы: паттерн-распознающие TLR-2, 3, 4, 9 происходит взаимодействие нейтрофила с вирусными частицами, ЛПС бактерий, а

также активированными тромбоцитами; через семейство FcR – с иммуноглобулинами и иммунными комплексами; с эндотелием и межклеточным матриксом через молекулы адгезии и рецепторы к ним (например MAC-1R); C3aR и C5aR – с компонентами комплемента; через CXCR1 с IL-8 [168]. Некоторые цитокины, такие как гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) и $IF\alpha/\gamma$ рассматриваются не столько в качестве непосредственных индукторов, но как вещества, повышающие чувствительность нейтрофилов к прочим активирующим влияниям [3]. Так, показано, что при контакте нейтрофилов с *C. albicans* и *S. aureus* формирование НВЛ происходит с активацией НАДФН-оксидазы и значительным ростом продукции АФК. В противоположность этому, НВЛ при воздействии *L. amazonensis* появляются без изменения степени продукции кислородных радикалов [138]. Образование ловушек при воздействии ИЛ-8 реализуется через активацию фосфолипазы С и повышение содержание внутриклеточного Ca^{2+} , с последующей активацией РКС и нарастанием продукции кислородных радикалов. Нефизиологические индукторы, способны проникать в клетку, напрямую запуская эффекторные механизмы. Так ФМА, действуя на РКС, включает сигнальный путь Raf/MEK/ERK [35], итогом чего является увеличение сродства РКС к Ca^{2+} , что сопровождается её активацией, а также способствует перемещению цитозольных фракций НАДФН-оксидазы на мембрану, где осуществляется её окончательная сборка и переход фермента в активное состояние, обуславливая “респираторный взрыв” [33]. ФМА-индуцированный нетоз является классическим примером НАДФН-оксидаза- и O_2 -зависимого пути формирования НВЛ. Действие иономицина приводит к формированию НВЛ, через увеличение содержания внутриклеточного Ca^{2+} и стимуляцию продукции АФК НАДФН-оксидаза-независимым способом [28, 35, 160].

Несмотря на указанное многообразие стимулов и недостаточную изученность более тонких внутриклеточных молекулярных и биохимических взаимодействий, действие их в конечном итоге приводит к запуску процесса деконденсации хроматина, ключевым участником, которого является фермент – ядерная

пептидиларгининдеиминаза (PAD4/PADI4) [34, 167], результатом работы, которой является конвертация остатка аргинина гистона H3 в цитруллин [61, 83, 146, 148]. Параллельно с этим процессом из азурофильных гранул в кариоплазму перемещается НЭ и МПО, протеолитически разрушая гистоны H2B и H4, итогом чего является глобальная деконденсация хроматина, увеличение расстояния между листками кариолеммы, её везикуляция, экзоцитоз комплекса ДНК, гистонов, НЭ и МПО в составе микровезикул, превращением клетки в безъядерную – при прижизненном нетозе, или же растворение ядерной мембраны, смешивание и гомогенизация деконденсированного хроматина и модифицированных гистонов с цитоплазматическими белками, АФК, компонентами гранул – при литическом типе [28, 83, 147, 168]. Наличие цитруллированных гистоновых белков не является при этом 100% признаком формирования НВЛ и может наблюдаться при так называемой лейкотоксической гиперцитрулликации (leukotoxic hypercitrullination, LTH) – НАДФН-оксидаза независимой и не обладающей бактерицидной направленностью реакции, по своим морфологическим проявлениям сходной с нетозом (смерть нейтрофила с выбросом ДНК) [41]. При её развитии происходит повышение уровня внутриклеточного Ca^{2+} , гиперактивация PAD4 и гибель клетки, являющаяся проявлением цитотоксического влияния факторов патогенности бактерий и способом противостояния иммунным реакциям организма [99]. Фермент PAD4 рассматривается в качестве ключевого эффектора нетоза и, закономерно, потенциальной терапевтической мишени. Показано, что при использовании синтетического ингибитора данного фермента Cl-амидина, удается значительно снизить степень продукции NETs *in vitro* в ответ на действие иономицина и *S. aureus*, однако этот эффект более характерен для животных моделей, и незначительно выражен в экспериментах с нейтрофилами человека [57, 83].

В качестве ещё одного ингибитора PAD4 необходимо указать Neonatal NET-inhibitory factor, короткий пептид, впервые обнаруженный у новорожденных и выделенный из пуповинной крови, где он, по мнению авторов исследования, препятствует формированию NETs, предотвращая повреждение эндотелия и развитие тромботических осложнений [119]. Кроме того, присутствие в крови

плода естественного иммуносупрессора кажется закономерным для поддержания благоприятных взаимоотношений в системе мать-плод.

SIRL-1 (Signal inhibitory receptor on leukocytes-1) – член суперсемейства трансмембранных рецепторов иммуноглобулинов, экспрессированный только на клетках миелоидного ряда таких как нейтрофилы, эозинофилы и моноциты. Лигандами для данного рецептора являются Fc-фрагменты иммуноглобулинов, при связывании которых наблюдается угнетение продукции АФК, без заметного влияния на фагоцитарную активность указанных иммунных клеток. Проведенные исследования показали, что инкубация нейтрофилов с плазмой крови больных системной красной волчанкой (СКВ), содержащей аутоантитела, подавляет процесс O₂-зависимого формирования НВЛ. Сохранность фагоцитарной функции была подтверждена при инкубации нейтрофилов с *S. aureus* опсонизированными антителами, где было показано внутриклеточное накопление микроорганизмов. Высокий уровень экспрессии данного рецептора подтвержден у интактных клеток, а низкий – в субпопуляциях с провоспалительным иммунофенотипом [165], что демонстрирует новый механизм саморегуляции и взаимодействия между врожденным и адаптивным звеньями иммунной системы. Описанные свойства SIRL-1, позволяют рассматривать его агонистов, в качестве специфичных ингибиторов нетоза, что особенно перспективно в контексте поиска новых терапевтических мишеней для лечения аутоиммунной патологии.

L.D. Nealy с соавторами (2017 год) изучали влияние активного протеина С на способность НГ формировать ДНК-ловушки и заявляют об ингибиторных свойствах указанной молекулы в отношении нетоза [40]. Способность препятствовать продукции НВЛ также экспериментально выявлена у цАМФ [156], лактоферрина [103] и тромбомодулина [158].

Говоря об оценке влияния того или иного фактора на процесс формирования НВЛ, необходимо помнить о наличии доза- и время-зависимых эффектов [90], а также об отсутствии на данный момент каких-либо единых стандартов и алгоритмов исследования данного явления, которое в подавляющем большинстве случаев проводится *in vitro* и не всегда представляется возможным

экстраполировать полученные данные *in vivo*. Использование искусственных активаторов, таких как РМА удобно для работы *in vitro*, т.к. при простоте и незначительном расходе дает гарантированный результат получения “ловушек” в культурах клеток, однако он не является физиологическим стимулом, и формирование НВЛ у подавляющего числа нейтрофилов, вероятно, не встречается в реальных клинических ситуациях [4, 118]. Многие определяется конкретными задачами исследования: изучение влияния компонентов уже сформированных “ловушек” на интересующие физиологические параметры, например свёртывание крови, или же задача заключается в изучении тонких внутриклеточных механизмов во время самого процесса нетоза.

В целом список событий, способных праймировать нейтрофилы и запускать в них программу формирования НВЛ широкий и разнообразный. Наличие многочисленных неспецифических индукторов, а также факт того, что феномен НВЛ *in vivo* наблюдается не более чем у 7-22% НГ из всей популяции [144], можно рассматривать в качестве типичного проявления их генетического и как следствие, функционального и морфологического полиморфизма.

1.4. Нейтрофильные внеклеточные ловушки в патогенезе инфекционных и неинфекционных заболеваний

В свете постоянно обновляемых знаний о морфологических и функциональных особенностях ПМЯЛ, закономерно возникает необходимость пересмотра их патогенетического вклада в развитие различного рода заболеваний с учётом наличия НВЛ. Несмотря на многообразие межклеточных и гуморальных взаимодействий ПМЯЛ, основной их функцией остаётся защита от инфекционных агентов, где роль НВЛ заключается в захвате, иммобилизации и уничтожении патогенов. Внедрившиеся микроорганизмы могут активировать нейтрофилы при непосредственном контакте через систему Pattern Recognize Receptors – PRR, к которой относятся TLR 2-9, в их числе рецепторы распознающие ЛПС Грамотрицательных бактерий. Кроме того, возможна активация, опосредованная АПК и прочими клетками иммунной системы, а также активированными

тромбоцитами, которые, способны взаимодействовать с микроорганизмами через TLR 9, накапливая патогены на своей мембране, а также при контакте НГ с клетками органов, пораженных бактериями, вирусами и/или грибами [134, 140]. Независимо от способа активации, мигрировавшие в очаг нейтрофилы формируют НВЛ, в которые, как в паутину, попадают инфекционные агенты. Сетеподобная структура НВЛ и их отрицательный поверхностный заряд [61, 114, 163], способствует тесному контакту с микроорганизмами и их иммобилизации, многочисленные протеазы, дефензины и АФК, выделяющиеся из гибнущего нейтрофила, оказывают прямой цитотоксический эффект на сам патоген и/или на инфицированную клетку. Кроме того, существует предположение, что нейтрофилы способны “оценивать” размер микроорганизма, и в случае крупного (относительно самого нейтрофила) патогена или их агрегатов, например при грибковых инфекциях, формированию НВЛ будет отдано предпочтение, как наиболее эффективной тактике, обеспечивающей большую площадь атаки [141]. Неоспоримыми преимуществами подобной защитной программы являются уничтожение одной клеткой сразу нескольких микроорганизмов, их фиксация в очаге и предотвращение диссеминации по организму, иммуностимулирующий эффект фрагментов внеклеточной ДНК, в особенности митохондриальной [36, 113, 176], что способствует активации новых популяций лейкоцитов, миграции их в очаг и его окончательное очищение от патогенов, погибших собственных клеток и тканевого детрита.

Однако бактерии за многие годы совместной эволюции выработали способы сопротивления иммунным механизмам, в том числе и НВЛ. Экспериментально показано, что *S. pneumoniae* и *S. aureus* попадают в НВЛ, но не гибнут в них, в связи с продукцией ими эндонуклеазы (ДНКаза-I), разрушающей ключевой компонент ловушки – ДНК-сеть, освобождая микроорганизмы, сохранившие способность к размножению и последующей диссеминации [114, 168]. Однако, когда речь идёт о тяжелой инфекционной патологии или осложнениях таких как сепсис, применение ДНКазы, в качестве лечебной меры совместно с антибиотиками, показало себя как эффективная терапевтическая стратегия [131], бьющая сразу по двум мишеням: с

одной стороны противомикробные препараты непосредственно уничтожают бактерии, с другой – ДНКаза разрушает циркулирующую внеклеточную ДНК, препятствуя её избыточному накоплению, и предотвращая лавинообразное увеличение продукции протеаз и провоспалительных цитокинов, которое и приводит к срыву адаптационных резервов организма и делают течение инфекционного процесса практически неуправляемым. Необходимо отметить, что предложенный способ лечения показал максимальную эффективность при сепсисе и эндотоксическом шоке, и был гораздо менее эффективен в случае локализованного инфекционного процесса [131]. Отличный от вышеописанного способ уклонения от иммунного ответа описан у условнопатогенной бактерии *P. aeruginosa*, которая способна адсорбировать на своей мембране сиаловые кислоты, покрывающие клетки организма-хозяина, и скрывающаяся таким образом от контакта с иммунной системой. Кроме этого, наличие на поверхности упомянутых сиалогликопротеинов, позволяет микроорганизму контактировать непосредственно с НГ через siglec-9 (lectin-like receptor 9), стимулируя продукцию ИЛ-10, трансформирующий фактор роста бета 1 (Transforming growth factor β 1, TGF- β 1), и ослабляя синтез АФК, что приводит к иммуносупрессии, и как показано, такие НГ формируют НВЛ значительно слабее [95].

Так же как одна инфекционная патология отличается от другой, в зависимости от конкретного возбудителя, так и процесс формирования НВЛ, и их окончательный состав, приобретает специфические черты, отражающие особенности патогенеза заболевания в целом: при грибковых инвазиях в состав “ловушек” будет включаться калпротектин [127]; при контакте с микобактериями туберкулёза активированные нейтрофилы выделяют ИЛ-8,10 и IFN- β , способствуя развитию преимущественно клеточного иммунного ответа. Некоторые исследователи предлагают понятие “disease-specific NETs” [96], подразумевающее наличие некоторой специфичности окончательного комплекса компонентов сформированной НВЛ, определяемой стимулирующим влиянием. Это означает, что сама суть процесса остается неизменной, однако в каждой конкретной ситуации нейтрофил действует по аналогии с формированием микровезикул и

экзосом, “выбирает” какие именно компоненты, помимо основных (ДНК, гистоны, МПО, НЭ) будут включены в НВЛ. Чем именно определяется окончательный набор компонентов достоверно неизвестно, но вероятнее всего выбор будет зависеть от общего влияния конкретного индуктора, исходного клеточного иммунофенотипа и соответственно от того афферентного пути, по которому клетка получила активирующее влияние, т.е. рецептор(ы) или их комплекс. С одной стороны данное явление может иметь диагностическое значение, с другой – заставляет проявлять осторожность при оценке экспериментов *in vitro*, т.к. есть вероятность вместо объективного, получить “нужный”, но при этом недостоверный результат, основанный на выборе неподходящего стимулятора.

Таким образом НВЛ, являются полноправными участниками инфекционных процессов, не вступая в противоречие с накопленными на данный момент знаниями о механизмах развития, но, уточняя и дополняя их. То же справедливо и для асептического воспаления [92], в частности аутоиммунного [130], а также случаев травм и оперативных вмешательств.

Так, установлено, что в патогенезе псориаза, кроме ранее изученных Th17, ключевыми участниками являются внеклеточные сети нейтрофилов и тучных клеток, несущие провоспалительный ИЛ-17, НЭ, которые в комплексе с ДНК, стимулируют плазмоцитойдные дендритные клетки к выделению IFN-1, активации аутоагрессивных Т-лимфоцитов и чем способствуют прогрессированию заболевания [64, 150].

В патогенезе СКВ НГ уже давно определены как одни из ключевых участников. Исследования последних лет, в частности открытие феномена НВЛ, конкретизировали их вклад в развитие данной патологии. Из крови больных СКВ среди моноцитарной фракции были выделены LDN, представляющие собой незрелые гранулоциты, несущие антигенные детерминанты как моноцитов, так и нейтрофилов. Данная субпопуляция клеток является активными продуцентами INF-1 и ИЛ-17, а также склонна к формированию НВЛ, в том числе спонтанному, в большей степени нежели зрелые нейтрофилы. Высокой активностью данной фракции и избытком указанных цитокинов, объясняется в том числе и выраженное

повреждение эндотелия и раннее быстрое развитие атеросклероза. Кроме этого, у таких пациентов снижена активность ДНКазы-I, что ведет к длительной циркуляции фрагментов НВЛ, способствующей развитию иммунного воспаления, поддержанию продукции ДНК-аутоантител, стимуляции активности системы комплемента, хроническому повреждению эндотелия, в том числе протеазами, с развитием васкулитов, гиперкоагуляции и исходом в нефропатию. Специфичными для данной патологии компонентами НВЛ являются также катионный микробицидный пептид кателицидин (LL37), альфа-дефензины, HMGB1 (high-mobility group protein B1, ядерный белок с провоспалительными свойствами), а также НЭ, МПО и катепсин G [42, 121].

Учитывая вышеприведенные особенности, существует вероятность пострансляционной модификации любого из компонентов НВЛ, в результате которой изменяется их химическая структура, пространственная ориентация, молекулярная масса и соответственно функциональная активность, кроме того, они могут приобретать свойства аутоантигенов [96, 99, 145], что в условиях извращенного иммунного ответа, имеет особое патогенетическое значение [7, 23].

В свете возросшего интереса к физиологии НГ, особенно в контексте феномена НВЛ, всё чаще в научных работах, затрагивающих эту тему, стал звучать термин иммунотромбоз (от англ. *immunotrombosis*), отражающий единство иммунного ответа как такового и фибринообразования, как механизма локализации патологического процесса. НВЛ, в особенности, формирующиеся в сосудистом русле, являются тем морфологическим субстратом, которые это единство реализуют, за счёт того, что одни и те же их компоненты обладают как иммунными свойствами, так и способностью влиять на гемостаз [123, 157]. Несмотря на то, что механизмы изменения коагулологических параметров под влиянием НВЛ стали исследоваться относительно недавно, уже накоплены данные, позволяющие оценить их патогенетический вклад в развитие ряда социально значимых неинфекционных заболеваний, таких как атеросклероз, тромбоз глубоких вен, ишемическая болезнь сердца, а также гиперкоагуляция при онкопатологии [55, 81, 128].

1.4.1. Нейтрофильные внеклеточные ловушки в системе гемостаза

Рассматривая участие НВЛ в процессах гемостаза, необходимо учитывать, что за счёт прямого контакта (рецептор-лиганд) с активированными эндотелиоцитами и тромбоцитами (P-selectin-PSGL 1; CD11b/CD18-ICAM 1; β 2 Integrins-ICAM 1; GPIb-Mac 1) и/или продуцируемыми ими цитокинами (ИЛ-8), возможен прайминг НГ к нетозу. Однако возможен и обратный вариант, когда нейтрофилы и компоненты НВЛ (вкДНК и гистоновые белки) сами выступают активаторами кровяных пластинок и интактного эндотелия, путём взаимодействия через молекулы адгезии (межклеточные взаимодействия), а также через TLR 2, 4, 7 и 9 тромбоцитов с гистоновыми белками и вкДНК [32, 89, 152]. Переход любой из вышеуказанных клеток в активированное состояние закономерно сопровождается усилением экспрессии молекул адгезии, а также активной продукцией специфичных для них цитокинов [2]. Так тромбоциты секретируют АДФ, фактор фон Виллебранда (VWF), fVIII, тромбоксан A_2 (TxA_2), серотонин, адреналин, фибронектин, усиливают экспрессию молекул адгезии для контакта с субэндотелиальным матриксом и волокнами фибрина; эндотелиоциты секретируют ИЛ-1, ИЛ-8, фактор активации тромбоцитов (PAF), ингибитор пути тканевого фактора (TFPI), тканевой активатор плазминогена (tPA), фактор фон Виллебранда (VWF) fVIII, экспрессируют на мембране и выделяют в составе микровезикул тканевой фактор (ТФ), продуцируют протеины С и S, тромбомодулин, антитромбин III (АТ-III), а также множество других коагулологически активных соединений [1, 8, 15, 16, 73]. Как известно существует два пути запуска процесса свёртывания крови – внешний с участием ТФ и внутренний (контактный); при взаимодействия активированных НГ и НВЛ с тромбоцитами и эндотелием способны индуцировать оба этих механизма [10, 11, 24]. Роль НВЛ в запуске контактного пути заключается в обеспечении наличия полианионной поверхности вкДНК, необходимой для активации фактора Хагемана. Прокоагулянтная активность вкДНК имеет внушительную экспериментальную доказательную базу, однако, следует учитывать, что в *in vitro* моделях используется преимущественно чистая ДНК, не связанная с гистоновыми

белками. Высокоочищенная вкДНК активирует контактный путь коагуляции и способствует тромбообразованию в том числе при полном отсутствии ТФ, кроме этого, её многочисленные анионные группы обеспечивают связывание и локализацию факторов свертывающей и фибринолитической систем, способствуя генерации и тромбина и затрудняя фибринолиз [32, 80, 98]. Положительно заряженные гистоны обладают высокой аффинностью к фосфолипидам мембран, оказывая прямое цитотоксическое действие, что ведет к летальному исходу в экспериментах с лабораторными животными [108]. Меньшая концентрация гистоновых белков стимулируют эндотелиоциты к синтезу и экспрессии VWF, ТФ, антитромбина-III и других коагулологических активных компонентов и цитокинов [68, 76]. Выделяемый активированными клетками эндотелия ИЛ-8 и TNF α в свою очередь обеспечивает накопление НГ в зоне повреждения и праймирует их к нетозу. Гистоны активируют тромбоциты путём взаимодействия их с ФЛ мембран, а также через контакт с TLR [38, 125, 137, 155]. При этом для гистона H1 описаны противоположенные свойства- замедление генерации тромбина, удлинение времени свертывания крови и ускорение фибринолиза. Описанные выше биологические эффекты характерны для высокоочищенных мелких фрагментов ДНК и свободных гистонов [57, 108]. Экспериментально показано, что прокоагулянтные, проагрегантные и цитотоксические их свойства в значительной степени утрачиваются при исследовании крупных комплексов таких как нуклеосомы или хроматин и только фрагменты вкДНК размером более 300 пар оснований обладают прокоагулянтными свойствами, так же как интактные, не разделенные на фрагменты НВЛ не оказывают повреждающего действия на эндотелий [45, 80, 89, 137]. Таким образом остается открытым вопрос о зависимости биологических в том числе коагулологических эффектов компонентов хроматина от чистоты и размера, что закономерно необходимо учитывать при планировании экспериментальных исследований и анализе их результатов.

Несмотря на существующие противоречия относительно физико-химических свойств отдельных компонентов хроматина, доказано, что в локализованных на эндотелии НВЛ клеточные и неклеточные компоненты гемостаза могут

механически “задерживаться” и накапливаться, что также способствует их взаимоактивации и дальнейшему тромбообразованию. При этом формирующиеся волокна фибрина и фибронектин, стабилизируют и постепенно уплотняют формирующийся тромб [63]. Другими клетками способными взаимодействовать с ДНК НВЛ являются эритроциты, значительное количество которых характерно для венозных тромбов, где медленный ток крови располагает к накоплению красных кровяных телец в ловушках. Однако, кроме увеличения объёма тромба за счёт электростатических и механических взаимодействий с НВЛ, эритроциты способны провоцировать гиперкоагуляцию путём экспрессии на мембране фосфотидилсерина [60, 76, 85], обеспечивая обширную фосфолипидную поверхность, на которой разворачивается коагуляционный каскад.

Источником активного ТФ даже в условиях интактного эндотелия являются как тромбоциты и моноциты, экспрессирующие его на мембране и продуцирующие его в составе микровезикул, так и сами НГ, которые способны экспрессировать молекулы ТФ на мембране, а также улавливать и накапливать, несущие его микровезикулы в НВЛ в очаге коагуляции [87, 116, 171]. Активный ТФ образует комплекс с фактором VIIa, запуская каскад внешнего пути. Наличие комплекса ТФ и компонентов НВЛ подтверждается иммуногистохимическими исследованиями артериальных тромбов, извлеченных у пациентов во время операций реваскуляризации коронарных сосудов, а также у животных в экспериментальных моделях [60]. При этом количество ТФ и НВЛ коррелирует с тяжестью заболевания и/или его исходом, выступая диагностическим и прогностическим критерием [66, 86, 88]. Так уровень экспрессии ТФ, комплекс вкДНК и циркулирующая вкДНК при остром коронарном синдроме были достоверно выше в случае исхода его в инфаркт миокарда, по сравнению со случаями нестабильной стенокардии или спонтанного восстановления проходимости коронарных артерий [66, 100, 171].

Обобщив вышесказанное, можно заключить, что активные межклеточные взаимодействия ключевых участников гемостаза (эндотелий, тромбоциты, НГ) приводят к их взаимоактивации, запуская механизм порочного круга [54, 101, 174].

Привлеченные в область тромбообразования, НГ формируют НВЛ на поверхности эндотелия, что обеспечивает локальное накопление клеточных и неклеточных коагулологических активных участников, а также являющихся каркасом, механически и электростатически “обрастающим” волокнами фибрина, уплотняя и стабилизируя тромб, делая его более устойчивым к действию антикоагулянтной и фибринолитической систем [53, 62, 110, 151, 152, 155]. Кроме этого, НЭ в НВЛ осуществляет протеолиз TFPI, стимулируя внешний путь коагуляции [171]. Стоит также отметить, что протеолитическая активность НВЛ в системном кровотоке может ограничиваться вследствие контакта протеолитических ферментов НВЛ с плазменными ингибиторами сериновых протеаз (антитрипсин, антихимотрипсин, α 2-макроглобулин). Однако в процессе гемостаза, локализованные в НВЛ ферменты изолируются от общего кровотока новыми слоями клеток и волокон, что способствует восстановлению их активности и последующему неспецифическому протеолизу тромба и, при благоприятном исходе, реканализации сосуда [97].

В артериальном звене многогранный вклад НВЛ в процессы тромбообразования с учётом описанных механизмов, можно продемонстрировать на примере патогенеза атеросклероза, а венозном – наглядным примером служит тромбоз глубоких вен.

Атеросклероз – это воспалительное заболевание сосудистой стенки, морфологическим выражением которого являются бляшки, формирующиеся в интиме, в результате постепенного накопления в ней липидов и развития хронического воспаления. При этом, влияние нетоза на течение данного процесса реализуется как в самой сосудистой стенке, так и со стороны просвета сосуда, где НГ и их внеклеточные ловушки включаются в многочисленные межклеточные взаимодействия. В интиме комплекс вкДНК-гистоны через TLR-7 и 9 оказывает прямое стимулирующее действие на плазмоцитойдные дендритные клетки, что проявляется в усилении продукции ими IFN-1, который в свою очередь индуцирует синтез IL-1 β тканевыми макрофагами и активацию пула Th17, поддерживая клеточный ответ и хемотаксис иммунных клеток, в том числе НГ, в зону формирования бляшки, продукцию ими провоспалительных цитокинов и АФК, что

усугубляет дисфункцию эндотелия, увеличивает его проницаемость для кристаллов холестерина, поддерживая постепенный рост патологического очага. Протеолитическая активность НВЛ при этом вносит свой вклад в разрушение межклеточного матрикса, истончение соединительнотканной оболочки бляшки и её дестабилизацию с последующим развитием осложнений [59, 60, 88, 104, 175]. Как было сказано выше, активация циркулирующих НГ, может привести к адгезии их к активированными и поврежденным эндотелиоцитами без последующей экстравазации. В этом случае формирование НВЛ будет происходить со стороны просвета сосуда, что приведёт к прямому активирующему и повреждающему воздействию “ловушек” на эндотелиоциты и проявляется локальной гиперкоагуляцией, нарастанием турбулентности кровотока и дестабилизацией бляшки, разрывом её капсулы и тромбообразованием в месте дефекта, клинически проявляющим себя в виде, например, острого коронарного синдрома [14, 24, 58, 60, 100, 163].

Тромбоз глубоких вен (ТГВ) – это патологическое состояние, характеризующееся образованием тромбов в венах, в результате нарушения реологических свойств крови, замедления скорости кровотока и/или повреждения эндотелия. Возникает преимущественно в венах нижних конечностей при варикозной болезни и является одной из основных причин тромбоэмболии легочной артерии. Благоприятные условия для развития ТГВ возникают также при онкопатологии, аутоиммунных заболеваниях, болезнях крови и при системных и местных воспалительных процессах в отличие от атеросклероза для ТГВ не обязательно наличие дефектов эндотелия, а для развития его дисфункции и активации, достаточно локального замедления скорости кровотока, сопровождающего растяжением сосудистой стенки, а также повышения вязкости крови с развитием гипоксии и метаболического ацидоза [1, 11, 16]. Вышеуказанные условия в то же время способствуют и активации НГ, их хемотаксису и адгезии на поверхности эндотелия, сопровождающейся в том числе формированием НВЛ [52, 104]. При этом уровень циркулирующей вкДНК и нуклеосом коррелирует с

выраженностью клинических проявлений, зависящих от распространенности и интенсивности процессов тромбообразования [32, 37, 72, 125, 137, 144].

Тяжелое течение многих заболеваний (сепсис, акушерская патология, опухолевые процессы, обширные травмы и т.п.) сопровождается генерализованным расстройством коагуляции с развитием ДВС-синдрома или же хронической гиперкоагуляции, при этом вклад НГ и НВЛ в их патогенез в полной мере укладывается в существующие представления о механизмах данного процесса. Сепсис и септический шок можно рассматривать как один из примеров необратимого срыва адаптационных возможностей организма, когда летальный исход определяется не столько нарастанием бактериемии, сколько дисрегуляцией защитных систем и компенсаторных механизмов (иммунной, гемостаза, сердечно-сосудистой, эндокринной; протеазный и цитокиновый “взрыв” и т.д.), лежащей в основе фатальных сдвигов гомеостаза [65, 67, 69, 75, 91]. Гиперстимуляции подвергается и популяция НГ, как первая линия противомикробной обороны, а развивающаяся при этом генерализованная их активация обеспечивает массивный выброс цитокинов, микробицидных и протеолитических ферментов и АФК, как в свободном виде так и составе НВЛ (ядерная и митохондриальная вкДНК, гистоновые белки), которые вкуче обладают не только провоспалительным, но и прокоагулянтным эффектом, определяя инициацию ДВС-синдрома. Развивающаяся при этом (согласно вышеописанным механизмам) гиперкоагуляция, краткосрочная ввиду быстрого истощения запасенных внутриклеточных БАВ, прогрессивного снижения количества ФСК и антипротеаз, гибели лейкоцитов и нарастающей тромбоцитопении [29, 58, 69, 74, 178]. Очевидно, что имеет место ряд факторов, определяющих индукцию и прогрессирование ДВС, однако конкретизировать степень участия в нём НВЛ удалось относительно недавно. На экспериментальной модели сепсиса у мышей продемонстрировано улучшение показателей микроциркуляции и уменьшение летальности при введении ДНКзы-1, а также у PAD4-дефицитных животных, по сравнению с контрольной группой, что в первую очередь связано со значительным снижением количества циркулирующих нуклеосом и фрагментов ядерной и

митохондриальной вкДНК, которые являются мощными провоспалительными и прокоагулянтными факторами, т.е. воспринимаются иммунными клетками как сигнал смертельной опасности, а также в связи с меньшим уровнем повреждения эндотелия и активации тромбоцитов [47, 58, 131, 143, 152, 178].

1.4.2. Нейтрофильные внеклеточные ловушки при онкопатологии

Проводимые в данной области исследования рассматривают процесс нетоза как способствующий опухолевой прогрессии и метастазированию за счет разрушения компонентов межклеточного матрикса, в том числе стенок сосудов, ослаблению межклеточных контактов, создания своеобразного экрана, изолирующего раковые клетки от контакта с лимфоцитами и натуральными киллерами (НК), а также растормаживанием “спящих” атипичных клеток и индукцией их роста и размножения [25, 105, 120, 135, 136, 153]. При этом наблюдается некоторая вариативность количества образованных НВЛ, зависящая от типа опухоли и формируемого ей цитокинового микроокружения, в частности интенсификация нетоза характерна для G-CSF-продуцирующих опухолей [50, 120, 136, 154]. В свете данных исследований становится понятно, что причиной и источником повышенного по сравнению со здоровыми лицами количества циркулирующей вкДНК, характерного для онкологических процессов, являются в значительной степени НВЛ, что наряду с гиперпродукцией атипичными клетками тканевого фактора, обеспечивает развитие хронической гиперкоагуляции и тромботических осложнений [9, 26, 39, 173]. При этом в сосудах самой опухоли, НВЛ-индуцированных фатальных тромбозов, очевидно не происходит, что заставляет обратить внимание на особенности функционирования антикоагулянтной системы и процессы фибринолиза, которым исследователи уделяют меньше внимания. Онкологическая патология, является с одной стороны примером состояния хронической гиперкоагуляции, а с другой – интенсивного фибринолиза, необходимого для поддержания кровоснабжения, неоангиогенеза и инвазии опухоли [50, 51]. Известно, что опухолевые клетки продуцируют и/или экспрессируют на своей мембране компоненты фибринолитической системы такие как тканевой (tPA) и урокиназный активаторы плазминогена (uPA) и их рецепторы

(uPAR) [44], а также ингибиторы активатора плазминогена 1 и 2 типов (PAI). Повышенный уровень активаторов фибринолиза положительно коррелирует с агрессивным ростом опухоли [32, 71, 80, 81]. D.F. Draxler с соавторами (2019 год) исследовали развитие инфекционных осложнений у пациентов хирургического профиля влияние после назначения транексамовой кислоты и заявляют о её иммуномодулирующем влиянии, основанном на блокаде эффектов плазминогена/плазмина [172]. Таким образом интенсивный фибринолиз может способствовать быстрому росту опухолевого узла не только в связи с поддержанием достаточного кровообращения опухоли и её инвазии в окружающие ткани, но и быть основан на стабильно повышенной концентрации плазминогена/плазмина, обладающего иммуносупрессивными свойствами. При этом роль НВЛ в этой системе остается не ясной. Нет данных и о склонности к нетозу опухоль-ассоциированных нейтрофилов (TANs), а также полиморфноядерных супрессорных клеток миелоидного происхождения (англ. polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells, PMN-MDSC), обнаруживающихся у больных онкологического профиля и, обладающих проопухолевыми свойствами, путем подавления активности Т-лимфоцитов [82, 114]. Данное направление представляется перспективным с точки зрения выявления иммунных молекулярных маркеров циркулирующих нейтрофилов, ассоциированных с той или иной патологией в том числе наличием субклинического опухолевого процесса, и продуцирующих специфичные “рабочие” цитокины и/или их комбинацию, а также в возможности более глубокого понимания взаимодействия и взаиморегуляции врожденного и адаптивного иммунитета. В этой связи можно предположить существование особенностей течения процессов гемостаза и/или фибринолиза в зависимости от заболевания и, участвующих в развитии патологического процесса, популяций клеток.

Таким образом представленные данные в полной мере отражают суть понятия иммунотромбоз и не несут в себе противоречий относительно причин и условий формирования НВЛ.

1.5. Заключение

С момента открытия НВЛ в 2004 году взгляд на описываемое явление претерпел значительные изменения от недоумения относительно необходимости суицидального поведения НГ при наличии множества других протективных стратегий до понимания биологической целесообразности их вне- и внутрисосудистых эффектов, причин и механизмов формирования, а также патогенетического вклада в развитие широкого ряда инфекционных и неинфекционных заболеваний [38, 43, 93, 95, 132]. В контексте данного феномена, возросший интерес к физиологии лейкоцитов, позволил по-иному оценить степень их регуляторных влияний, выявить новые механизмы межклеточных взаимодействий и внутриклеточного метаболизма, а также в корне изменить представление о НГ, лишь как о конечно дифференцированных эффекторных клетках системы врожденного иммунитета, но рассматривать их как новое интегральное звено между ключевыми системами, обеспечивающими защиту и адаптацию организма при наличии сдвигов гомеостаза. Вновь обратило на себя внимание наличие фенотипического полиморфизма нейтрофилов и его потенциальная прогностическая и диагностическая роль, как у здоровых индивидуумов, так и при наличии патологии. Кроме того НВЛ, а также субпопуляции НГ, склонные к их формированию, представляются перспективными терапевтическими мишенями при ряде заболеваний, преимущественно аутоиммунных, онкологических и нарушениях гемостаза. При этом некоторые аспекты феномена НВЛ можно считать недостаточно изученными на данный момент. К ним, стоит отнести генетические основы, которые на фундаментальном уровне позволили бы связать функциональные и иммунофенотипические различия НГ, с предрасположенностью к тем или иным заболеваниям [78, 94, 118]. Другим перспективным и активно развивающимся направлением, не изученным в рамках феномена НВЛ, является исследование особенностей межклеточного взаимодействия, например путем продукции экзосом, в составе которых, клетка может выделять не только активные регуляторные молекулы, но и микроРНК, что

позволяется рассматривать данный коммуникативный механизм на стыке генетики и иммунологии. Не существует на сегодняшний день и стандартизации различных методов выявления нетоза (сходство с ЛТН), что затрудняет интерпретацию полученных данных, и тормозит разработку дополнительных диагностических и прогностических критериев, а также внедрение их в реальную клиническую практику [109].

Таким образом, накопленные данные позволяют рассматривать феномен НВЛ в качестве полноправного участника многообразных физиологических процессов и примером эволюционно древнего интегративного механизма, объединяющего в одно целое пути реализации врожденного и адаптивного иммунитета и гемостаза. Дисрегуляция нетоза ведёт к превращению его из адаптивного механизма в патологический, что и наблюдается при многочисленных и разнородных заболеваниях, ещё раз указывая на единство всех структур организма.

ГЛАВА 2. Материалы и методы

2.1. Дизайн исследования. Исследование проводилось в двух группах: в группе пациентов («Z») и группе контроля («К»). На предварительном этапе группу «Z» составили 20 больных со злокачественными новообразованиями толстого кишечника 2-3 стадии (11 мужчин, 9 женщин, в возрасте 50-65 лет), поступившие на плановое оперативное лечение – первичное удаление опухоли, в Забайкальский краевой онкологический диспансер города Читы; группу «К» составили добровольцы, сопоставимые по полу и возрасту и, не имеющие онкологического процесса – 15 человек (8 мужчин и 7 женщин в возрасте 50-65 лет) (Таблица 1).

На основном этапе группу «Z» составили 17 больных со злокачественными новообразованиями толстого кишечника St II-III без метастазов (8 мужчин и 9 женщин в возрасте 55-81 лет), поступившие на плановое оперативное лечение – первичное удаление опухоли, в Забайкальский краевой онкологический диспансер города Читы; группу «К» составили добровольцы, сопоставимые по полу и возрасту и, не имеющие онкологического процесса – 30 человек (15 мужчин и 15 женщин в возрасте – 57-83 лет) (Таблица 3). У каждого донора и пациента получено письменное добровольное информированное согласие на участие.

Исследование проводили в два последовательных этапа – предварительном и основном. На предварительном этапе проверяли возможность воспроизведения процесса нетоза в аутоплазме *in vitro*, а также его влияние на особенности фибринообразования, фибринолиза и концентрацию тканевого фактора. На основном этапе проверяли воспроизводимость метода, а также уточняли результаты предварительного этапа. Для работы использовали периферическую венозную кровь, с антикоагулянтом 3,2% раствором цитрата натрия. Из цельной

крови получали отдельно плазму бедную тромбоцитами и суспензию НГ, из которых далее готовили экспериментальные *in vitro* модели изучаемого процесса. После чего исследовали их коагулологические и фибринолитические свойства.

Таблица 1

Характеристика групп контроля и пациентов на предварительном этапе

	Пациенты n=20	Группа контроля n=15	P
Возраст, среднее (М)	58,1	57,7	0,95*
Мужчины, n (%)	11	8	0,8 ^a
Гемоглобин, (г/л) М	115	135	<u>0,0004*</u>
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$ М	4,6	4,88	0,3*
Лейкоциты, $\times 10^9/л$ М	12,6	5,8	<u>P<0,001*</u>
Нейтрофилы, $\times 10^9/л$ М	8,67	3,48	<u>P<0,001*</u>
Лимфоциты, $\times 10^9 / М$	2,14	1,7	0,14*
Моноциты, $\times 10^9 / М$	1,08	0,3	<u>P<0,001*</u>
Тромбоциты, $\times 10^9/л$ М	432,9	202	<u>P<0,001*</u>
СОЭ, мм/час М	28,7	9	<u>P<0,001*</u>

P- значимые отличия между сравниваемыми группами при $P<0,05$ (*- t-тест Стьюдента, ^a- χ^2 Пирсона)

Критерии исключения из исследования:

1. Регулярный прием или продолжающийся курс приема антикоагулянтов и/или антиагрегантов (ацетисалициловая кислота, клопидогрел, пентоксифиллин, дипиридамол, гепарин и низкомолекулярные гепарины, варфарин, апиксабан, дабигатран), гирудотерапия, химиотерапия онкопатологии, заместительная гормонотерапия.
2. Врожденные заболевания системы гемостаза.

3. Перенесенные в течение последних 6 месяцев тяжелые воспалительные и инфекционные заболевания, обострения ишемической болезни сердца, травмы, отравления, ожоги, оперативные вмешательства, кровопотеря и переливание препаратов крови.
4. Гемобластозы и прочие онкологические заболевания в анамнезе.
5. Сахарный диабет.

Включение доноров в исследование производилось на основании данных анкетирования. Отсутствие онкологического процесса в группе контроля дополнительно подтверждали данными медицинской документации – амбулаторными картами, содержащими сведения о прохождении регулярного флюорографического обследования, диспансеризации и отсутствии данных о злокачественном процессе. Каждому участнику исследования перед принятием решения о включении его в группу контроля выполняли термометрию и общий анализ крови. Донора исключали из исследования в следующих случаях: при температуре тела более 37°C, HGB<120 г/л, RBC<4,0×10¹²/л, WBC>9×10⁹/л, СОЭ>10 мм/час.

Включение пациентов в исследование производилось на основании данных истории болезни: основного и сопутствующих диагнозов, анамнеза, данных лабораторных исследований.

На предварительном этапе исследования у представителей каждой группы забирали 15 мл периферической венозной крови в пробирки с 3,2% раствором цитрата натрия (SarsStedt, Германия), на основном этапе – 25 мл в аналогичные пробирки.

2.2. Предварительный этап исследования

Целью предварительного этапа явилось выявления факта влияния НГ и процесса нетоза на особенности фибринообразования и фибринолиза, а также содержание нейтрофильной эластазы и тканевого фактора в бедной тромбоцитами аутоплазмы (БТаП) у доноров и онкобольных.

2.2.1 Исследование особенностей фибринообразования

Получение бедной тромбоцитами аутоплазмы

1. Центрифугирование цельной крови на скорости 1500 оборотов/минуту (об/мин)- 15 минут, перенос около 40% супернатанта после первого этапа в отдельную пробирку.
2. Центрифугирование супернатанта после первого этапа на скорости 3000 об/мин в течение 10 минут. Отбор полученной бедной тромбоцитами плазмы-супернатанта в отдельные пробирки.

Изоляция нейтрофильных гранулоцитов из цельной крови

1. Цельную кровь разводили раствором фосфатного буфера в соотношении 2:1 и центрифугировали на двойном градиенте плотности фиколла-урографина (1,077/1,093) в течение 35 минут на скорости 1500 об/мин при комнатной температуре. После центрифугирования получали расслоение цельной крови на плазму и клеточные элементы в следующем порядке (в направлении сверху вниз): плазма – кольцо мононуклеарных лейкоцитов – градиент – кольцо гранулоцитов – градиент – плотный осадок эритроцитов (на дне пробирки).
2. Гранулоциты (нижнее клеточное кольцо) переносили в отдельную пробирку. Для отмывания клеток от остатков градиента к суспензии добавляли раствор фосфатного буфера (ФБР) в соотношении 1:2. После этого клетки осаждали центрифугированием в течение 10 минут на скорости 1500 об/мин. Супернатант, содержащий градиент и ФБР, отбирали.
3. Далее выполняли лизис остаточных эритроцитов: к клеточному осадку после центрифугирования добавляли лизирующий раствор (VersaLyse Lysing Solution, Beckman Coulter, США) в соотношении 1 мл раствора на 100 мкл суспензии клеток, перемешивали и оставляли на 7-13 минут.
4. По истечении указанного времени суспензию клеток центрифугировали 7 мин на скорости 1500 об/мин, супернатант удаляли и заменяли на 4 мл культуральной среды RPMI1640.

5. Количество клеток считали с использованием гематологического счетчика, жизнеспособность клеток проверяли окрашиванием 0,4% раствором метилового синего с последующим анализом в камере Горяева. Количество НГ в суспензии доводили до $4,5-6 \cdot 10^6$ /мл, при жизнеспособности культуры не менее 98%.

Подготовка экспериментальных моделей

1. 1 мл аликвоты суспензии НГ помещали в отдельные пробирки типа эппендорф и центрифугировали 7 мин на скорости 1500 об/мин, чтобы осадить клетки. Супернатант отбирали.

2. Далее в одну пробирку вносили 5 мкл 0,9% раствора NaCl и 500 мкл БТаП, быстро перемешивали и получали суспензию интактных НГ (иНГ) в аутоплазме. Во вторую пробирку вносили 5 мкл (100 нмоль) индуктора нетоза – форбол-12-миристан-13-ацетата (ФМА), перемешивали, затем вносили 500 мкл БТаП, вновь перемешивали, получали суспензию активированных НГ (аНГ) в аутоплазме. В итоге получали 2 экспериментальных образца – один с интактными НГ и один – с ФМА-активированными НГ.

3. В качестве контроля на предварительном этапе исследования использовали образцы БТаП без клеток: а) образец свежей БТаП с внесенными 5 мкл 0,9% раствора NaCl – образец обозначали как «control NaCl» и б) образец БТаП с внесенными 5 мкл ФМА для исключения влияния активатора на исследуемые свойства плазмы- обозначали как «control act».

4. Инкубация образцов НГ в БТаП: пробирки с суспензией интактных и активированных НГ, а также контрольные образцы плазмы помещали в термостат для инкубации при 37°C на 240 минут. По истечении времени инкубации пробирки центрифугировали в течение 5 минут на скорости 10 000 об/мин. Плазму-супернатант каждого образца отбирали в отдельные пробирки для дальнейшего анализа.

Исследование тромбодинамики в каждом образце плазмы

Исследование особенностей фибринообразования в каждой экспериментальной модели проводили с использованием метода регистрации пространственного роста фибринового сгустка на аппарате «Регистратор тромбодинамики Т2» (ГемаКор, Россия) согласно протоколу производителя.

2.2.2. Исследование фибринолитических свойств интактных и активированных нейтрофильных гранулоцитов методом фибриновых пластин (ФП) по Аструпу

Подготовка ФП

1.1. Для приготовления одной ФП использовали 2 мл 13% водного раствора фибриногена (Каунас, лифилизированный) и 20 мкл раствора тромбина (100 NIH Units/mL; Helena, Великобритания).

1.2. Смешивали растворы тромбина и фибриногена в отдельных пластиковых чашках для культур клеток, куда вначале вносили раствор фибриногена, затем тромбина, быстро перемешивали и оставляли на ровной поверхности до образования фибринового геля.

1.3. Половину (условно 5 из 10) ФП после приготовления прогревали (с закрытой крышкой для предотвращения высыхания) в течение 60 минут при 90°C для инактивации компонентов фибринолитической системы. Каждую ФП маркировали как прогретую – пФП или непрогретую – нФП.

1.4. На поверхности слоя фибрина в каждой чашке (как прогретых, так и непрогретых) проводили иглой тонкую засечку по диаметру пластины, с целью разделить поверхность фибрина на 2 половины. На левую половину, локально примерно посередине, наносили 15 мкл раствора ингибитора протеаз – апротинина (Sigma Aldrich, Aprotinin from bovine lung saline solution 3-7 TIU/mg protein, Германия), на правую половину – 15 мкл 0,9% раствора NaCl.

Подготовка экспериментальных моделей

2.1. Готовили суспензию НГ в среде RPMI1640 согласно схеме, приведенной в пункте «Подготовка экспериментальных моделей».

2.2. 1 мл аликвоты суспензии НГ в среде RPMI1640 помещали в отдельные пробирки, в одну из пробирок вносили 5 мкл 0,9% NaCl, в другую – 5 мкл (100 нмоль) ФМА, быстро перемешивали.

2.3. Затем поверх растворов в соответствующие области ФП помещали отдельно по 50 мкл суспензии иНГ и аНГ. Таким образом получали восемь вариантов ФП:

Таблица 2. Варианты фибриновых пластин

1. нФП+0,9% NaCl+иНГ	5. пФП+0,9% NaCl+иНГ
2. нФП+апротинин+иНГ	6. пФП+апротинин+иНГ
3. нФП+0,9% NaCl +аНГ	7. пФП+0,9% NaCl +аНГ
4. нФП+апротинин+аНГ	8. пФП+апротинин+аНГ

2.4. Далее чашки с ФП закрывали крышкой и инкубировали в термостате при 37°C в течение 20 часов. По истечении времени инкубации площадь зон лизиса каждой ФП измеряли в мм².

2.2.3. Исследование концентрации тканевого фактора и нейтрофильной эластазы

После инкубации и центрифугирования экспериментальных и контрольных образцов, отбирали по 100 мкл плазмы, переносили в отдельные пробирки, замораживали и хранили при температуре -25°C. Измерение концентрации искомым веществ проводили методом ELISA (ELISA Tissue factor, Cloud Clone Corp., США; ELISA Neutrophil elastase, Cloud Clone Corp., США).

2.3. Основной этап исследования

Основной этап исследования концептуально повторял дизайн предварительного в части создания экспериментальных моделей.

**Характеристика групп контроля и пациентов на основном этапе
исследования**

	Пациенты n=17	Группа контроля n=30	P
Возраст, среднее (M)	68	67	0,8*
Мужчины/женщины, n	15/15	15/15	0,5 ^a
Гемоглобин, (г/л) M	91,3	126,1	<u>0,0001*</u>
Эритроциты, ×10¹²/л M	3,9	4,5	<u>0,0003*</u>
Лейкоциты, ×10⁹/л M	6,9	5,9	0,2*
Нейтрофилы, ×10⁹/л M	4,4	3,2	0,1*
Лимфоциты, ×10⁹ / M	2,1	2,1	0,5*
Моноциты, ×10⁹ / M	0,5	0,4	0,2*
Тромбоциты, ×10⁹/л	260,9	196,6	0,09*
СОЭ, мм/час M	23	7	<u>0,001*</u>

Данные приведены в виде средних (M); P- значимые отличия между сравниваемыми группами при P<0,05 (*- t-тест Стьюдента, ^a- χ^2 Пирсона)

На данной стадии мы исключили из исследования контрольный образец плазмы «Control act», использованный нами на предварительном этапе с целью исключить влияние активатора на результаты измерений. Также мы увеличили объем плазмы с 500 мкл до 1 мл, при использовании 4,5-6×10⁶/мл НГ, в связи с большим количеством запланированных исследований для каждого образца. Для работы использовали 25 мл периферической венозной крови, забранной в пробирки с 3,2% раствором цитрата натрия (SarsStedt, Германия). Прочие этапы пробоподготовки, включая создание модели нетоза, не изменились. Таким образом, в основном этапе исследования участвовали три образца БТаП:

1. PPP – один контрольный образец исходной БТаП – 1 мл

2. INT – один образец БТаП после инкубации в ней интактных НГ – 1мл
3. PMA – один образец БТаП после инкубации в ней, индуцированных к нетозу НГ – 1мл

2.3.1. Флюоресцентная микроскопия нейтрофильных внеклеточных ловушек

Для этого готовили чашки для выращивания клеточных культур. Для лучшей адгезии клеток на дно каждой чашки наливали 2 мл Poly-L-lysin (Sigma Aldrich, Германия), высушивали в термостате при 60°C в течение часа. После получения взвеси НГ в среде RPMI1640, в две отдельных подготовленных чашки из отбирали 1 мл суспензии клеток. После этого в одну чашку вносили 5 мкл индуктора нетоза ФМА (100 нмоль/мл) перемешивали, в другую – 5 мкл 0,9% раствора NaCl, накрывали крышкой и помещали в термостат для инкубации на 4 часа при 37°C. По истечении времени инкубации, из каждой чашки отбирали супернатант, адгезированные клетки отмывали раствором фосфатного буфера и вносили 10 мкл флюоресцентного красителя Sytox Green (Beckman Coulter, США) в 500 мкл ФБР. Перемешивали и оставляли для инкубации в темном месте на 15 минут. После этого клетки трехкратно отмывали раствором ФБР и выполняли микроскопию с использованием микроскопа Zoe Fluorescent Cell Imager ×20 (BioRad, США).

2.3.2. Измерение уровня внеклеточной ДНК

После этапа инкубации все образцы центрифугировали 10 минут на скорости 1500 об/мин для осаждения взвеси клеток, затем в отдельные пробирки отбирали 100 мкл плазмы каждого образца, замораживали, хранили при температуре -25°C. Измерение выполняли методом ELISA (Cell Death Detection ELISA^{plus}, Roche, Германия) с целью выявления различий между донорами и пациентами, а также с целью подтвердить успешность индукции нетоза.

2.3.3. Исследование особенностей фибринообразования и фибринолиза

После этапа инкубации и центрифугирования, согласно протоколу производителя и аналогично предварительному этапу, отбирали 120 мкл плазмы каждого образца и сразу же выполняли расширенный тест тромбодинамики с

исследованием фибринолиза на аппарате «Регистратор тромбодинамики Т2» (HemaCor, Россия). Оценка динамики роста и лизиса фибринового сгустка осуществлялась по следующим параметрам: начальная (V_i) и стационарная (V_{st}) скорости роста сгустка, размер сгустка (CS), плотность сгустка (D), время задержки роста сгустка (T_{lag}), время появления спонтанных сгустков (T_{sp}), время начала лизиса сгустка (LOT), динамика лизиса (LP) и время необходимое для полного лизиса сгустка (LTE).

2.3.4. Измерение концентрации некоторых компонентов плазмы крови, участвующих в процессах тромбообразования и фибринолиза

После этапов инкубации и центрифугирования, отбирали по 50 мкл плазмы каждого образца, замораживали, хранили при температуре -25°C . Измерение выполняли методом проточной цитометрии с использованием двух наборов для мультиплексного анализа – Human Thrombosis Panel (BioLegend, США) и Human Fibrinolysis Panel (BioLegend, США) на проточном цитометре CytoFlex (Beckman Coulter, США). Измеряли содержание следующих компонентов: тканевой фактор (ТФ), IX фактор свертывания крови (IX), XIII фактор свертывания крови (XIII), протромбин (PT), фибриноген (Fib), плазминоген/плазмин (PLS), тканевой активатор плазминогена (tPA), ингибитор активатора плазминогена 1 типа (PAI-1), D-димер (DD), P-селектин (PS), PSGL-1, ИЛ-6, ИЛ-8, антитромбин-III.

2.3.5. Измерение уровня микровезикул, несущих тканевой фактор MP-CD142+

После отбора из каждого образца необходимого для вышеуказанных исследований количества биоматериала, получали остаток плазмы в объеме 650 мкл. Его использовали для изучения количества микровезикул, несущих тканевой фактор – MP-CD142+. Для этого центрифугировали каждый образец 45 мин на скорости 22000 об/мин при температуре 4°C (Sigma, 12110-H, США). После центрифугирования отбирали 90% плазмы-супернатанта, к осадку добавляли 150 мкл ФБР, тщательно перемешивали. Затем 50 мкл отбирали в отдельные пробирки,

куда далее вносили смесь антител: CD142-CD16, перемешивали и оставляли на 15 минут в темном месте. По истечении 15 минут в каждую пробирку вносили 300 мкл фиксирующего раствора, перемешивали и осуществляли измерение методом проточной цитометрии на аппарате Cytomics FC-500 (Beckman Coulter, США).

Статистическая обработка. Проведена с использованием пакета программ STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc., США). Перед анализом результатов все полученные вариационные ряды тестировались на нормальность распределения с использованием теста Шапиро-Уилка. Все данные представлены как медиана и 25 и 75 процентиля – $Me[Q0,25; Q0,75]$. Для сравнения результатов внутри групп контроля и пациентов использовали тест Уилкоксона для зависимых совокупностей, для сравнения независимых групп- групп контроля и пациентов использовали U-тест Манна-Уитни, t-тест Стьюдента и χ^2 Пирсона использовали для сравнения групп по возрасту, полу и данным общего анализа крови, значимыми считали отличия при $p < 0,05$. Для оценки связи между количественными признаками использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена, значимым считали $r_s > 0,3$ при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. Результаты

3.1. Результаты предварительного этапа исследования

3.1.1. Результаты предварительного этапа исследования в группе контроля

Исследование тромбодинамики. Выявлено замедление роста фибринового сгустка в образцах инкубированных в присутствии клеток. При этом наиболее чувствительным параметром оказалась начальная скорость роста (V_i), которая значимо снижалась как для плазмы с иНГ так и для аНГ относительно соответствующих контролей («control NaCl» и «control act») (Таблица 4).

Замедление роста сгустка также происходило за счет снижения скорости распространения роста (стационарной скорости роста – V_{st}), однако значимое отличие по данному параметру зарегистрировано только для образца с аНГ.

Таблица 4

Показатели тромбодинамики в группе контроля Me[Q0,25-Q0,75]

1	control NaCl	control act	иНГ	аНГ	<i>p</i>			
					p1	p2	p3	p4
2	3	4	5	6	7	8	9	
V_i МКМ/МИН	56,9 [53,4; 58,7]	57,3 [53,8; 59,2]	53,6 [52,1; 56,1]	52,7 [51,1; 56,5]	<u>0,003</u>	0,12	<u>0,0006</u>	<u>0,01</u>
V_{st} МКМ/МИН	32,8 [31,2; 36,1]	32,8 [31; 35,4]	31,6 [30; 34,6]	29,7 [29,2; 32,6]	0,25	0,97	<u>0,004</u>	0,25

Таблица 4. Продолжение

1	2	3	4	5	6	7	8	9
CS мм ²	1294 [1184; 1399]	1299 [1120; 1348]	1226 [1150; 1400]	1188 [1110; 1218]	<u>0,01</u>	0,3	<u>0,0006</u>	<u>0,002</u>
D усл. ед.	18720 [17261; 19888]	18711 [17215; 19856]	18009 [16781; 19522]	18692 [17232; 19540]	0,9	0,07	0,8	0,8
Tlag мин	1 [0,9; 1]	1 [0,9; 1]	0,8 [0,8; 1]	0,9 [0,8;1]	<u>0,005</u>	0,6	0,07	<u>0,005</u>
Tsp мин	–	–	–	–				

Vi – начальная скорость роста; **Vst** – стационарная скорость роста; **CS** – площадь сгустка; **D** – плотность сгустка, условные единицы; **Tlag** – задержка роста; **Tsp** – время появления спонтанных сгустков; **control NaCl** – бедная тромбоцитами аутоплазма с внесенными 5 мкл 0,9% раствора NaCl; **control act** – бедная тромбоцитами аутоплазма с внесенными 5 мкл ФМА; **иНГ** – суспензия интактных нейтрофилов в БТаП; **аНГ** – суспензия ФМА-активированных нейтрофилов в БТаП; **p1** – сравнение control NaCl/int; **p2** – сравнение control NaCl/ control act; **p3** – сравнение control act/аНГ; **p4** – сравнение иНГ/аНГ. Сравнение проведено с использованием теста Уилкоксона для зависимых совокупностей, значимыми считали отличия при $p < 0,05$.

Снижение скоростей роста закономерно привело к уменьшению итогового размера фибринового сгустка в экспериментальных образцах с минимумом для плазмы с аНГ (Таблица 4). Для параметра плотности фибринового сгустка, определяемого концентрацией фибриногена и активностью фактора XIII, зафиксировано незначительное снижение, однако отличия между опытными и контрольными образцами не значимы. Параметр задержки роста фибринового сгустка (Tlag) значимо изменялся только в образце плазмы с иНГ. Формирования спонтанных сгустков не зарегистрировано (Таблица 4).

Результаты измерения количества тканевого фактора и нейтрофильной эластазы в группе контроля. Инкубация БТП с иНГ привела к значимому изменению количества ТФ в исследованных образцах плазмы: при инкубации с аНГ, зафиксировано снижение содержания ТФ, с иНГ- к повышению его уровня (Таблица 5). Содержание НЭ снизилось в обоих экспериментальных моделях, однако значимые отличия получены только для образца плазмы с иНГ относительно контроля (control NaCl) (Таблица 5).

Таблица 5

Количество тканевого фактора и нейтрофильной эластазы в группе контроля Me[Q0,25-Q0,75]

	control NaCl	control act	иНГ	аНГ	<i>p</i>			
					p1	p2	p3	p4
ТФ пг/мл	4,86 [4,4; 4,7]	4,85 [4,4; 4,9]	4,93 [4,3; 5,11]	4,38 [4,1; 4,9]	<u>0,005</u>	0,3	<u>0,01</u>	0,25
НЭ нг/мл	5,85 [5,23; 5,9]	5,84 [5,19; 5,9]	3,93 [3,5; 4,74]	4,39 [3,9; 4,85]	<u>0,03</u>	0,9	0,3	<u>0,01</u>

ТФ – тканевой фактора **НЭ** – нейтрофильная эластаза; **control NaCl** – бедная тромбоцитами аутоплазма с внесенными 5 мкл NaCl; **control act** – бедная тромбоцитами аутоплазма с внесенными 5 мкл ФМА; **иНГ** – суспензия интактных нейтрофилов в БТаП; **аНГ** – суспензия ФМА-активированных нейтрофилов в БТаП; **p1** – сравнение control NaCl/int; **p2** – сравнение control NaCl/ control act; **p3** – сравнение control act/аНГ; **p4** – сравнение иНГ/аНГ. Сравнение проведено с использованием теста Уилкоксона для зависимых совокупностей, значимыми считали отличия при $p < 0,05$.

Результаты измерения фибринолитической активности в группе контроля. Нанесение суспензии клеток на поверхность ФП приводит к формированию в этом месте зоны лизиса фибрина. Площади зон лизиса больше на непрогретых ФП чем на прогретых ФП и максимальная зона фибринолиза зафиксирована в месте нанесения аНГ на нФП (Таблица 6). Если клеточная суспензия помещалась на поверхность с заранее нанесенным на неё ингибитором

протеаз апротинином, то формирования заметной области лизиса в этой зоне не отмечено.

Таблица 6

**Площадь зон лизиса фибриновых пластин в группе контроля
Me[Q0,25-Q0,75]**

Фибриновые пластины	Образцы		<i>p</i>
	иНГ	аНГ	иНГ/аНГ
нФП мм ²	15,1 [9; 19]	31,1 [26; 35]	<i>p</i> <0,001
пФП мм ²	4,9 [3; 8]	11,2 [9; 14]	<i>p</i> <0,001
нФП+апротинин мм ²	Нет лизиса	Нет лизиса	-
пФП+апротинин мм ²	Нет лизиса	Нет лизиса	-

нФП – площадь зон лизиса непрогретых фибриновых пластин; **пФП** – площадь зон лизиса прогретых фибриновых пластин; **иНГ** – образцы плазмы с интактными клетками; **аНГ** – образцы плазмы с активированными клетками; **p** – сравнение внутри группы контроля. Сравнение проведено с использованием теста Уилкоксона для зависимых совокупностей, значимыми считали отличия при *p*<0,05.

3.1.2. Результаты предварительного этапа в группе пациентов

Исследование тромбодинамики в группе пациентов. Формирование фибринового сгустка в группе пациентов по ряду показателей отличается от группы контроля, однако в целом соответствует состоянию гиперкоагуляции, а в случаях формирования спонтанных сгустков (Tsp) – тяжелой гиперкоагуляции, чего не наблюдалось в группе контроля (Таблица 4). Начальная скорость роста фибринового сгустка (Vi) больше, чем в группе контроля, в ходе эксперимента наблюдалось её уменьшение в образце с иНГ и незначимое увеличение для плазмы с аНГ (Таблица 7). Стационарная скорость роста (Vst) в среднем оказалась ниже, чем в группе контроля, но аНГ не повлияли на данный параметр, а незначительное увеличение Vst отмечено в образце с иНГ. Учитывая разнонаправленное изменение скоростей роста фибринового сгустка в образцах с иНГ, и отсутствие изменения

скорости роста в плазме с аНГ, значимого изменения окончательного размера сгустка (CS) в опытных образцах плазмы относительно контролей не зафиксировано, при этом средние размеры фибриновых сгустков в группе пациентов больше, чем в группе контроля (Таблица 7). Значения показателя плотности сгустка (D) в группе пациентов значительно превышают таковые в группе контроля, кроме того данный показатель является единственным, который значимо изменяется в образцах с аНГ. Таким образом у онкобольных в данном эксперименте процесс нетоза повлиял только на плотность фибринового сгустка (привел к её уменьшению). (Таблица 7). Не отмечено также изменения времени задержки роста сгустка (Tlag) в исследованных моделях (Таблица 7). В отличие от группы контроля, в некоторых образцах плазмы, полученной от онкобольных происходит формирование спонтанных сгустков, т.е. очаги коагуляции возникают в объеме плазмы, не связанной с поверхностью активатора, используемого в данном методе, что соответствует тяжелой гиперкоагуляции и характеризует собственный прокоагулянтный потенциал плазмы как очень высокий. При этом в образцах, инкубированных с клетками, спонтанные сгустки (Tsp) возникают раньше, чем в контрольных (Таблица 7).

Таблица 7

Показатели тромбодинамики в группе пациентов Me[Q0,25-Q0,75]

	control NaCl	control act	нНГ	аНГ	<i>p</i>			
					p1	p2	p3	p4
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Vi мкм/мин	62,3 [61,1; 63,5]	61,7 [60,8; 63,5]	58,4 [56,6; 59,6]	61,8 [61,2; 63,4]	<u>0,007</u>	0,2	0,18	<u>0,05</u>
Vst мкм/мин	30,1 [29,6; 32,1]	30,6 [29,5; 32,6]	30,3 [28; 31,7]	30,4 [29,7; 31,4]	<u>0,02</u>	0,7	0,6	0,8
CS мм ²	1311 [1260; 1374]	1309,5 [1235; 1387]	1287,5 [1211; 1364,5]	1333 [1310; 1345]	0,26	0,8	0,09	<u>0,001</u>

Таблица 7. Продолжение

1	2	3	4	5	6	7	8	9
D усл. ед.	27603,5 [25369; 30120]	27762 [26123; 29541]	28782 [26250; 30473]	27165 [25821; 28340]	<u>0,01</u>	1	<u>0,001</u>	0,7
Tlag мин	1 [0,9; 1]	1 [0,9; 1]	1 [0,9; 1]	1 [0,8; 1]	0,6	0,4	0,2	<u>0,03</u>
Tsp мин	26,1 [24,4; 28]	22,3 [21,2; 23,8]	17,3 [16,5; 19,8]	19,9 [17,7; 21,4]	<u>0,03</u>	0,06	0,05	0,07

Vi – начальная скорость роста; **Vst** – стационарная скорость роста; **CS** – площадь сгустка; **D** – плотность сгустка; **Tlag** – задержка роста; **Tsp** – время появления спонтанных сгустков; **control NaCl** – бедная тромбоцитами аутоплазма с внесенными 5 мкл NaCl; **control act** – бедная тромбоцитами аутоплазма с внесенными 5 мкл ФМА; **иНГ** – суспензия интактных нейтрофилов в БТаП; **аНГ** – суспензия ФМА-активированных нейтрофилов в БТаП; **p1** – сравнение control NaCl/иНГ; **p2** – сравнение control NaCl/ control act; **p3** – сравнение control act/аНГ; **p4** – сравнение иНГ/аНГ. Сравнение проведено с использованием теста Уилкоксона для зависимых совокупностей, значимыми считали отличия при $p < 0,05$.

Результаты измерения количества тканевого фактора и нейтрофильной эластазы в группе пациентов.

Таблица 8

Количество тканевого фактора и нейтрофильной эластазы в группе пациентов Me[Q0,25-Q0,75]

	control NaCl	control act	иНГ	аНГ	<i>p</i>			
					p1	p2	p3	p4
ТФ пг/мл	9,59 [8,7; 9,7]	9,57 [9,4; 9,7]	15,53 [12,1; 16,8]	11,84 [9,12; 13,2]	0,06	0,8	0,06	0,9
НЭ нг/мл	5,8 [5,51; 5,9]	5,49 [5,3; 5,6]	6,54 [6,2; 6,67]	6,07 [5,82; 6,4]	0,18	0,2	0,65	0,63

ТФ – количество тканевого фактора; **НЭ** – количество нейтрофильной эластазы; **control NaCl** – бедная тромбоцитами аутоплазма с внесенными 5 мкл NaCl; **control act** – бедная тромбоцитами аутоплазма с внесенными 5 мкл ФМА; **иНГ** – суспензия интактных нейтрофилов в БТаП; **аНГ** – суспензия ФМА-активированных нейтрофилов в БТаП; **p1** – сравнение control NaCl/иНГ; **p2** – сравнение control NaCl/ control act; **p3** – сравнение control act/аНГ; **p4** – сравнение иНГ/аНГ. **$p < 0,05$** – значимые отличия на основании теста Уилкоксона для зависимых выборок.

Количество ТФ в плазме крови онкобольных превышает таковое в плазме доноров, также для пациентов характерен большой разброс результатов. Инкубация плазмы в присутствии клеток приводит к увеличению содержания НЭ, с максимальным уровнем в образцах с иНГ. Образцы с аНГ содержат меньшее количество ТФ, однако оно превышает показатели контрольных образцов данной группы, и отличия, полученные для иНГ так и аНГ незначимы (Таблица 8). Количество НЭ также незначимо увеличивалось в экспериментальных образцах, с максимальным уровнем в плазме, инкубированной с иНГ, в отличие от группы контроля, где данный образец, наоборот содержал минимальную концентрацию НЭ (Таблица 5).

Результаты измерения фибринолитической активности в группе пациентов. Нанесение иНГ и аНГ на поверхность фибриновых пластин приводит к формированию зон лизиса большей площади чем в группе контроля. При этом обращает на себя внимание тот факт, что разница в площади зон между иНГ и аНГ меньше, чем у доноров, что свидетельствует о большей протеолитической активности иНГ онкобольных. Присутствие апротинина так же ингибирует фибринолиз (Таблица 9).

Таблица 9

Площадь зон лизиса фибриновых пластин в группе пациентов

Me[Q0,25-Q0,75]

Фибриновые пластины	Образцы	<i>P</i>
1	2	3

1	2		3
	иНГ	аНГ	иНГ/аНГ
нФП мм ²	19,35 [17; 21]	36,8 [33; 38]	<i>p<0,001</i>
пФП мм ²	8,6 [6; 12]	17,7 [16; 18]	<i>p<0,001</i>
нФП+апротинин мм ²	Нет лизиса	Нет лизиса	-
пФП+апротинин мм ²	Нет лизиса	Нет лизиса	-

нФП – площадь зон лизиса непрогретых фибриновых пластин; **пФП** – площадь зон лизиса прогретых фибриновых пластин; **иНГ** – образцы с интактными клетками; **аНГ** – образцы с активированными клетками; **p** – сравнение внутри группы пациентов (тест Уилкоксона для зависимых выборок), *p* – значимые отличия (*P<0,05*).

3.2. Результаты основного этапа исследования

3.2.1. Измерение уровня внеклеточной ДНК. До создания модели нетоза, мы оценили содержание внеклеточной ДНК (вкДНК), связанной с гистоновыми белками, а также исходное состояние процессов формирования и лизиса фибринового сгустка в обеих группах путем исследования исходной плазмы. Так содержание вкДНК в исходной плазме (К.РРР и Z.РРР) выше в группе контроля (Таблица 9). Значимое увеличение концентрации вкДНК отмечалось внутри групп в образцах плазмы после инкубации с интактными НГ (К.ИИТ и Z.ИИТ), при этом между собой данные образцы значимо не отличались. Ещё большее увеличение концентрации вкДНК зафиксировано в образцах с индуцированными к нетозу НГ в обеих группах (К.РМА и Z.РМА), что явилось одним из доказательств успешной индукции данного процесса в соответствующих образцах. При этом рост концентрации вкДНК внутри группы контроля (при сравнении между собой всех трех образцов), был выше, чем внутри группы пациентов: от 0,1 до 0,6 в контроле и от 0,1 до 0,3 у пациентов (Таблица 10).

Содержание вкДНК в образцах плазмы групп контроля и пациентов
Me[Q0,25-Q0,75]

	К. Группа контроля				P ^{kz}	Z. Группа пациентов		
		Значение показателя	P ^{int} P ^{pma}	P ¹		Значение показателя	P ^{int} P ^{pma}	P ²
вкДНК	PPP	0,111 [0,1; 0,109]			<u>0,02</u>	0,1 [0,1; 0,101]		
	INT	0,381 [0,22; 0,48]	0,007	<u>0,008</u>	0,1	0,26 [0,18; 0,33]	<u>0,0003</u>	0,01
	PMA	0,499 [0,4; 0,6]	0,008		<u>0,02</u>	0,34 [0,26; 0,41]	<u>0,0003</u>	

вкДНК – содержание внеклеточной ДНК (условные единицы оптической плотности); **PPP** – исходная бедная тромбоцитами плазма; **INT** – бедная тромбоцитами плазма после инкубации в ней интактных нейтрофилов; **PMA** – бедная тромбоцитами плазма после инкубации в ней индуцированных к нетозу нейтрофилов; **P^{int}** – сравнение INT с PPP внутри групп (по Уилкоксоу); **P^{pma}** – сравнение PMA с PPP внутри групп (по Уилкоксоу); **P^{kz}** – сравнение величины соответствующих показателей между группами контроля и пациентов (U-тест Манна-Уитни); **P¹** – сравнение между INT и PMA внутри группы контроля (по Уилкоксоу); **P²** – сравнение между INT и PMA внутри группы пациентов (по Уилкоксоу). P- значимые отличия ($p \leq 0,05$).

3.2.2. Визуализация нейтрофильных внеклеточных ловушек

Ниже представлены фотографии интактной культуры НГ в группе контроля (Рисунок 1) и в группе пациентов (Рисунок 2). Клетки выглядят как зеленые точки. Изображения НВЛ, полученные в группе контроля (Рисунки 3 и 4) и пациентов (Рисунки 5 и 6) демонстрируют нарушенную морфологию большинства клеток в поле зрения. Обширные сетеподобные, волокнистые структуры, связанные с клетками, являются волокнами ДНК, несущими на себе прочие ядерные, а также цитоплазматические компоненты.

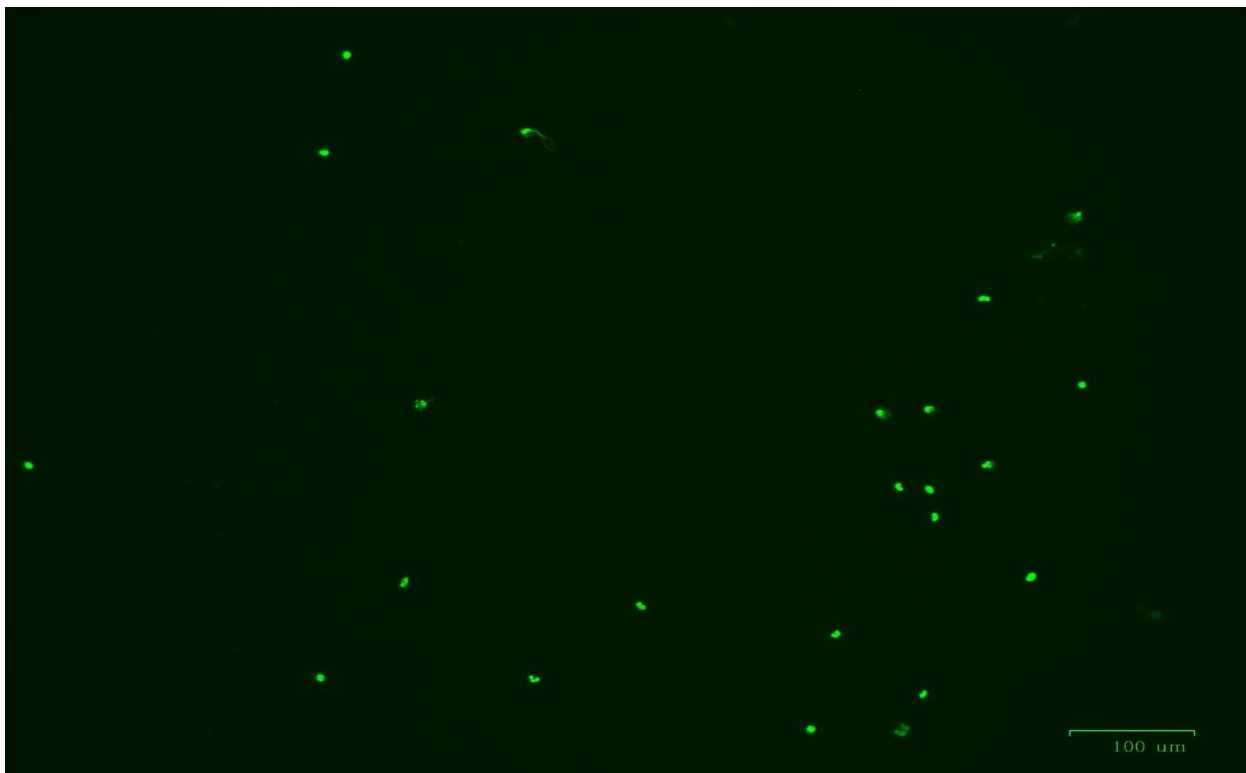


Рисунок 1. Фотография культуры интактных НГ в группе пациентов

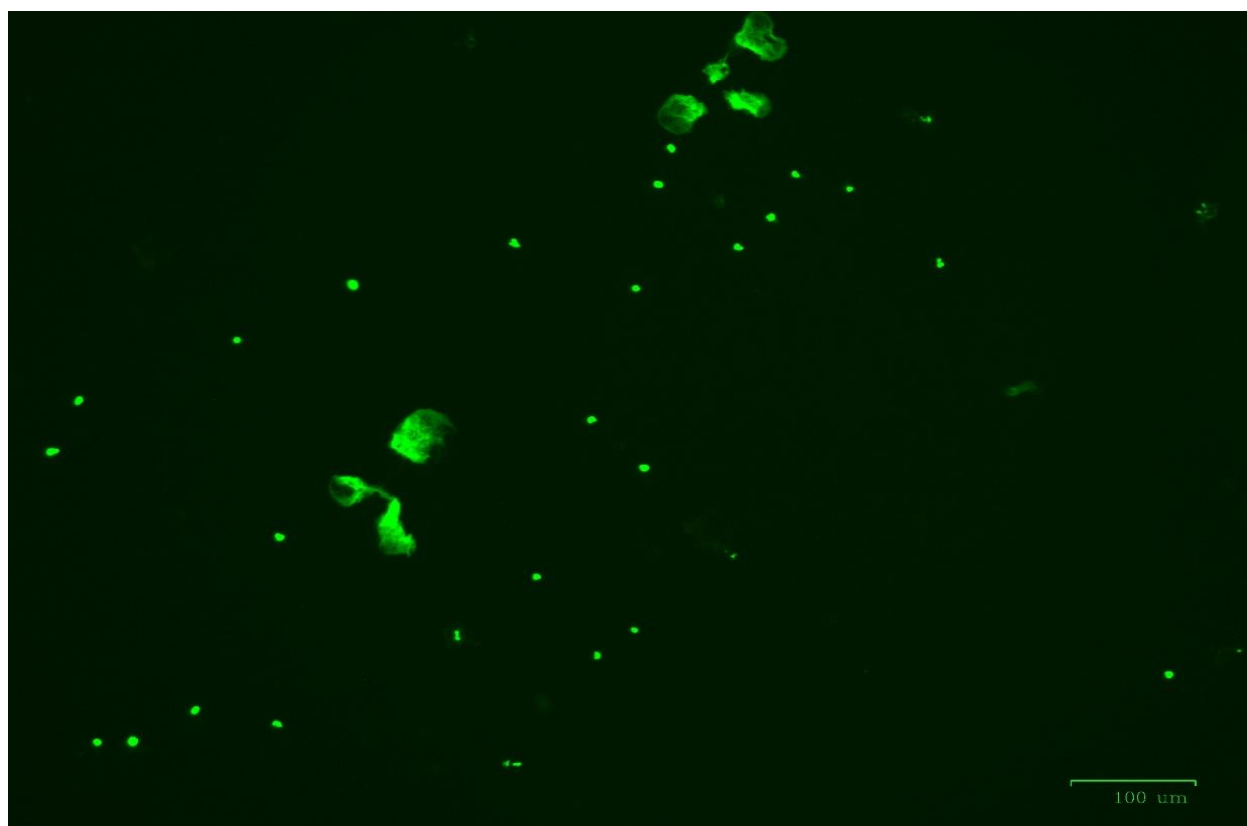


Рисунок 2. Фотография культуры интактных НГ в группе контроля

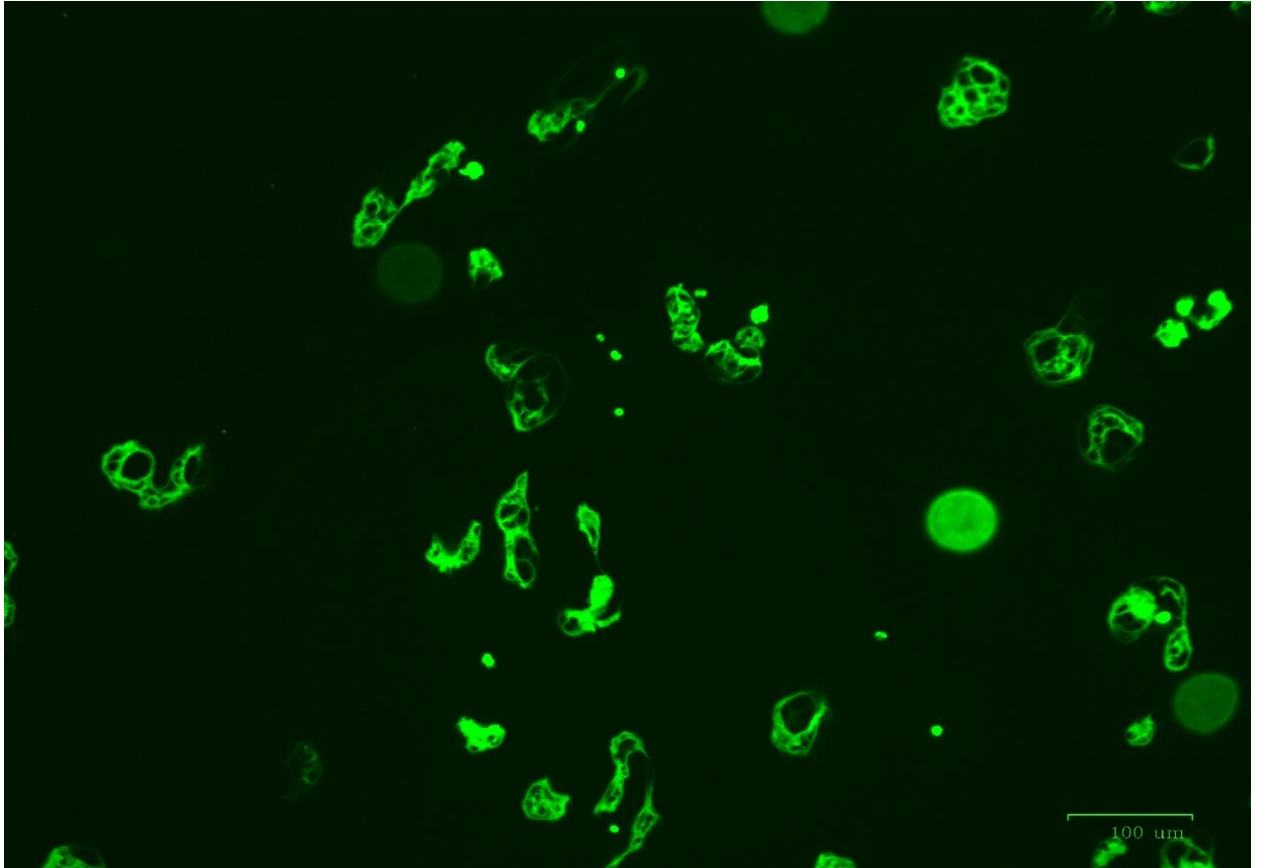


Рисунок 3. Фотография НВЛ в группе контроля

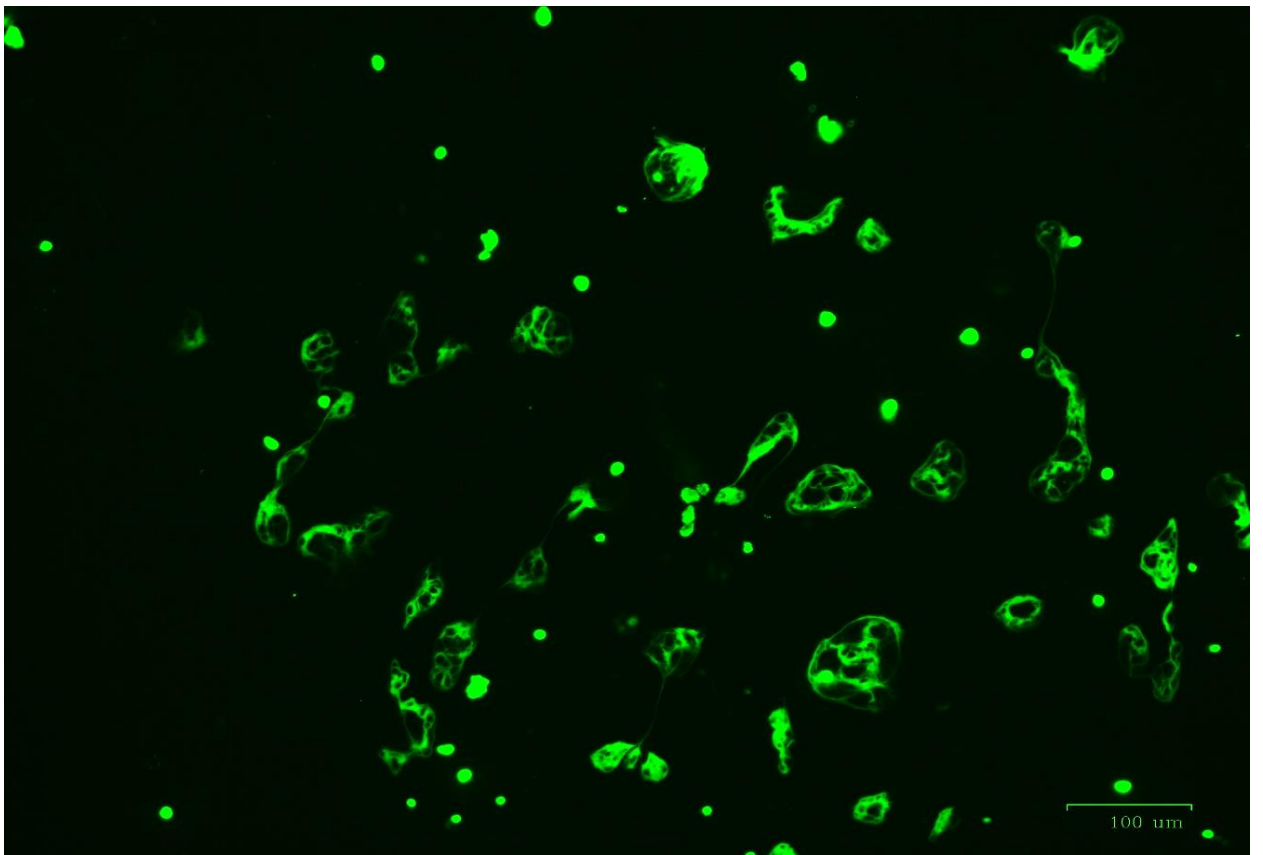


Рисунок 4. Фотография НВЛ в группе пациентов

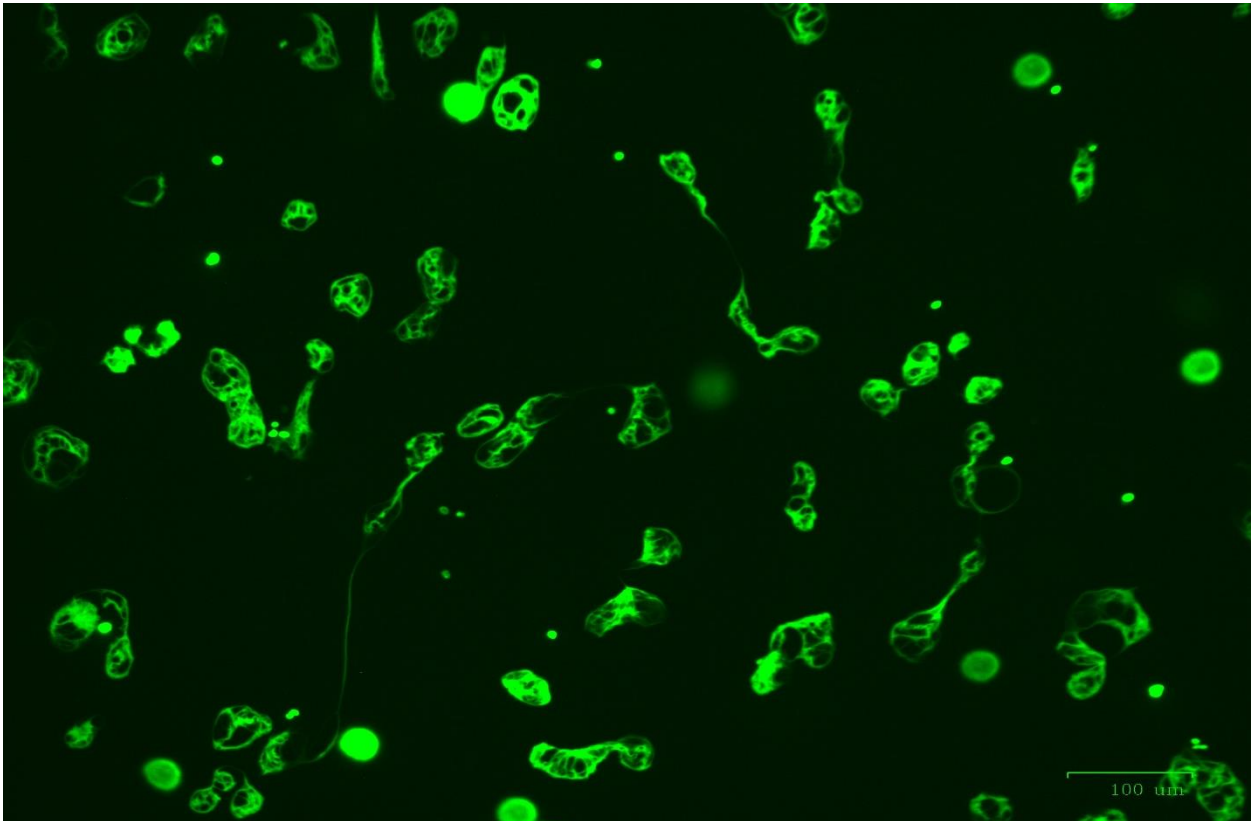


Рисунок 5. Фотография НВЛ в группе контроля

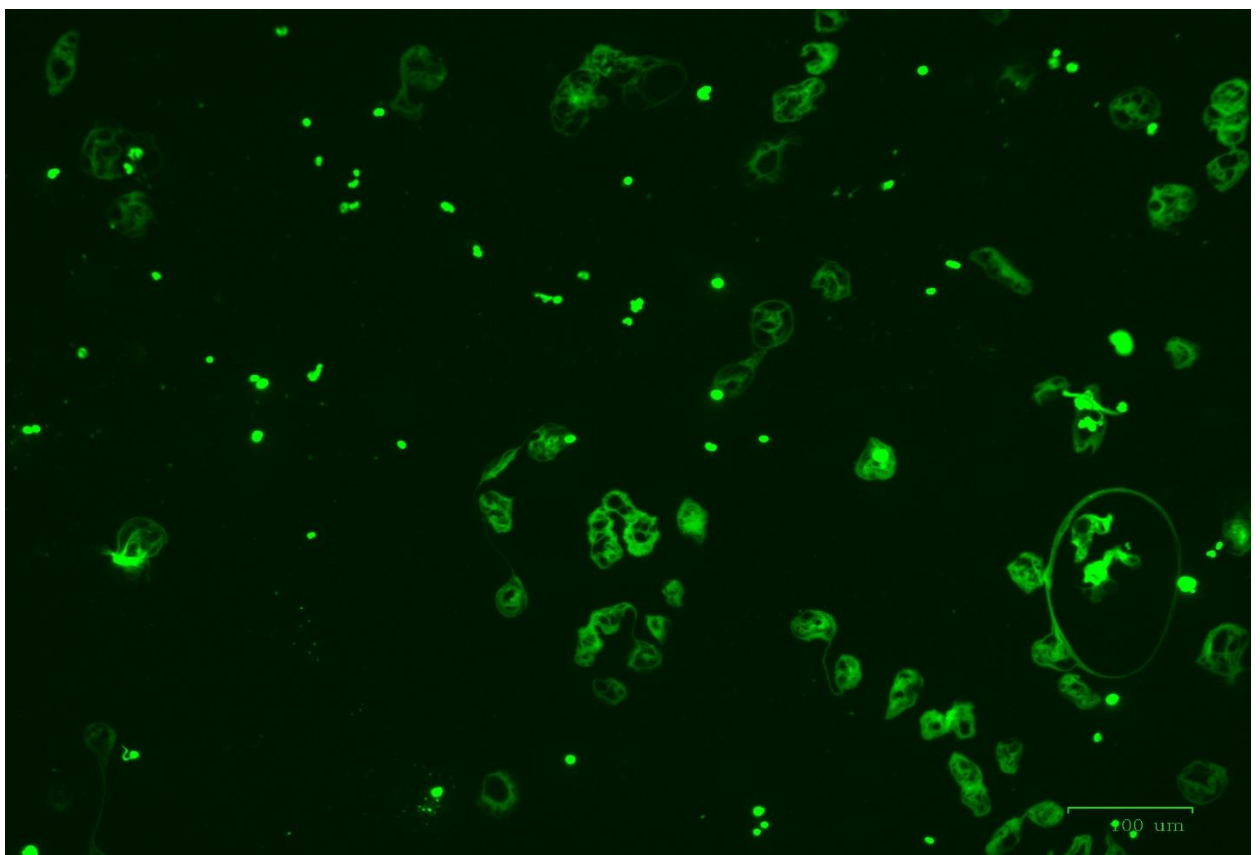


Рисунок 6. Фотография культуры интактных НГ в группе пациентов

3.2.3. Исследование показателей фибринообразования и фибринолиза. В расширенном тесте тромбодинамики с исследованием фибринолиза, аналогично данным предварительного этапа, выявлены значимые отличия между группами (Таблицы 11 и 12).

Таблица 11

Показатели фибринообразования по данным теста тромбодинамики в группах контроля и пациентов Me[Q0,25-Q0,75]

	К. Группа контроля				p _{KZ}	Z. Группа пациентов		
		Значение показателя	P ^{int} P _{pma}	P ¹		Значение показателя	P ^{int} P _{pma}	P ²
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Vi мкм/мин	PPP	60,1 [55,5; 61]			<u>0,0001</u>	67,7 [65; 71,4]		
	INT	57,6 [54,3; 60,6]	0,3	<u>0,05</u>	<u>0,0008</u>	63,9 [61,3; 67,9]	<u>0,04</u>	0,08
	PMA	56,8 [52,2; 58,8]	<u>0,05</u>		<u>0,006</u>	62,7 [60,3 ;66,6]	<u>0,02</u>	
Vst мкм/мин	PPP	31,98 [31,6; 33,5]			<u>0,0001</u>	49,2 [44,3; 54,2]		
	INT	34,4 [34;40,7]	<u>0,02</u>	<u>0,02</u>	<u>0,01</u>	47,2 [36,6; 58,3]	0,2	0,7
	PMA	33,1 [27,9;37,7]	0,8		<u>0,02</u>	46,7 [34,1;54,8]	0,4	
CS мм ²	PPP	1329 [1252;1381]			0,2	1350 [1325; 1501]		
	INT	1321 [1221;1443]	0,8	0,1	0,2	1386 [1306; 1510]	0,4	<u>0,02</u>
	PMA	1279 [1168;1395]	0,2		0,2	1253 [1205; 1389]	<u>0,01</u>	

Таблица 11. Продолжение

1	2	3	4	5	6	7	
D усл.ед.	PPP	16769 [14795; 20623]			<u>0,0002</u>	27221 [23643; 30118]	
	INT	17362 [16849; 19848]	0,3	<u>0,03</u>	<u>0,0001</u>	25125 [23351; 27902]	0,2
	PMA	16876 [15307; 17843]	0,5		<u>0,0001</u>	24045 [22361; 26442]	<u>0,0008</u>
Tsp мин	PPP	45,15 [43,5; 48,7]			<u>0,0001</u>	19,5 [17; 24,4]	
	INT	35,3 [33; 37,8]	<u>0,05</u>	0,5	<u>0,005</u>	21,7 [17; 29,8]	0,2
	PMA	33,6 [33,5; 36,2]	<u>0,05</u>		0,08	20,25 [15,1; 35,3]	0,07
Tlag мин	PPP	0,9 [0,90; 1,0]			0,6	0,9 [0,9; 1]	
	INT	0,9 [0,8; 1]	0,4	0,2	0,7	0,9 [0,9; 1]	0,4
	PMA	1 [0,9; 1]	0,3		0,8	1 [0,9; 1,2]	0,2

Vi – начальная скорость роста; **Vst** – стационарная скорость роста; **CS** – площадь сгустка; **D** – плотность сгустка; **Tlag** – задержка роста; **Tsp** – время появления спонтанных сгустков; **PPP** – исходная бедная тромбоцитами плазма; **INT** – бедная тромбоцитами плазма после инкубации в ней интактных нейтрофилов; **PMA** – бедная тромбоцитами плазма после инкубации в ней индуцированных к нетозу нейтрофилов; **P^{int}** – сравнение INT с PPP внутри групп (по Уилкоксоу); **P^{pma}** – сравнение PMA с PPP внутри групп (по Уилкоксоу); **P^{kz}** – сравнение величины соответствующих показателей между группами контроля и пациентов (по Манна-Уитни); **P¹** – сравнение между INT и PMA внутри группы контроля (по Уилкоксоу); **P²** – сравнение между INT и PMA внутри группы пациентов (по Уилкоксоу). P – значимые отличия ($p \leq 0,05$).

Так при сравнении показателей коагуляции доноров и пациентов, в исходной бедной тромбоцитами плазме в группе контроля (К.PPP) ожидаемо ниже скорость

роста сгустка (V_i , V_{st}), его плотность (D), позже происходило появления спонтанных сгустков, не связанных с активатором. При этом группа показателей, характеризующих фибринолиз, напротив, свидетельствует о значимо большей его интенсивности в группе пациентов (Z.PPP): увеличена динамика лизиса сгустка (LP) при меньшем отрезке времени, необходимом для полного его растворения после момента достижения максимальной плотности (LTE) и более раннем начале лизиса (LOT) (Таблица 12). По двум показателям – размер сгустка, время задержки роста и время начала лизиса (CS, Ptag) значимых различий между группами не выявлено.

Таблица 12

**Показатели фибринолиза по данным теста тромбодинамики в группах
контроля и пациентов Me[Q0,25-Q0,75]**

	К. Группа контроля				PKZ	Z. Группа пациентов		
		Значение показателя	P^{int} P^{PMA}	P^1		Значение показателя	P^{int} P^{PMA}	P^2
LOT мин	PPP	33,9 [33,9; 47,6]			<u>0,003</u>	23,9 [18,8; 32,4]		
	INT	30,2 [28,3; 40,7]	0,3	0,7	<u>0,02</u>	24,8 [16,7; 28,6]	0,4	0,5
	PMA	29 [28,1; 36,7]	0,9		<u>0,01</u>	24,1 [19; 25,5]	0,1	
LP %/мин	PPP	2 [1,7; 2,6]			<u>0,003</u>	8,5 [4,9; 14,9]		
	INT	2,7 [2,2; 2,9]	0,2	<u>0,01</u>	<u>0,0003</u>	8,8 [5,1; 12,4]	0,9	0,4
	PMA	3 [2,9; 3,8]	<u>0,01</u>		<u>0,001</u>	9,2 [4,7; 17,1]	0,7	
LTE мин	PPP	51 [40; 58]			<u>0,001</u>	18 [13,4; 25,9]		
	INT	40,6 [36,8; 50,6]	0,1	<u>0,02</u>	<u>0,002</u>	16,9 [12,6; 22,4]	0,4	0,8
	PMA	35,2 [27,8; 37,1]	<u>0,04</u>		<u>0,001</u>	16 [12,4; 24,8]	0,4	

Таблица 13. Продолжение

1	2	3	4	5	6	7	8	9
MP- CD142+ на 1 мкл	PPP	125 [85; 182]			0,5	161 [56; 217]		
	INT	182 [160; 195]	0,2	<u>0,007</u>	0,3	247 [112; 316]	0,1	0,2
	PMA	376 [234; 530]	<u>0,008</u>		0,6	271 [209; 499]	0,06	

MP-CD142+ – количество микровезикул, несущих тканевой фактор (в 1 мкл); **PPP** – исходная бедная тромбоцитами плазма; **INT** – бедная тромбоцитами плазма после инкубации в ней интактных нейтрофилов; **PMA** – бедная тромбоцитами плазма после инкубации в ней индуцированных к нетозу нейтрофилов; **P^{int}** – сравнение INT с PPP внутри групп (по Уилкоксоу); **P^{pma}** – сравнение PMA с PPP внутри групп (по Уилкоксоу); **P^{kz}** – сравнение величины соответствующих показателей между группами контроля и пациентов (U-тест Манна-Уитни); **P¹** – сравнение между INT и PMA внутри группы контроля (по Уилкоксоу); **P²** – сравнение между INT и PMA внутри группы пациентов (по Уилкоксоу). P – значимые отличия ($p \leq 0,05$).

Следующим шагом оценивали те же показатели в плазме, инкубированной с индуцированными к нетозу НГ в обеих группах (К.PMA и Z.PMA) с целью выявить влияние данного процесса на измеренные ранее показатели, т.е. провести сравнение внутри групп, а также выявить возможные различия в динамике и влиянии нетоза на систему гемостаза у онкобольных и в контроле. Внутри группы контроля плазма с высоким уровнем нетоза (К.PMA) значительно отличается от исходной (К.PPP), главным образом, по показателям фибринолиза – увеличилась динамика лизиса (LP) и уменьшилось время полного лизиса сгустка (LTE) (Таблица 12). Из характеристик коагуляции значимые отличия зафиксированы для T_{sp} – спонтанные сгустки образовывались на 12 минут быстрее чем в интактной плазме; уменьшилась начальная скорость роста сгустка (Vi). Конечный размер (CS), стационарная скорость (V_{st}), плотность (D), время задержки роста (T_{lag}) а также время начала лизиса (LOT) изменились незначимо (Таблица 11).

Концентрация компонентов системы фибринолиза в исследованных образцах плазмы в группах контроля и пациентов Me[Q0,25-Q0,75]

	К. Группа контроля				PKZ	Z. Группа пациентов		
		Значение показателя	P ^{int}	P ¹		Значение показателя	P ^{int}	P ²
			P ^{pma}				P ^{pma}	
PLS МКГ/МЛ	PPP	444,6 [367,4; 577,9]			<u>0,0002</u>	809,27 [773,9; 832,08]		
	INT	547,1 [475; 732,5]	<u>0,02</u>	<u>0,008</u>	<u>0,007</u>	805,1 [783,7; 825,6]	0,7	0,9
	PMA	767,7 [662; 864,1]	<u>0,01</u>		0,7	820 [787,9; 845,04]	0,8	
tPA МГ/МЛ	PPP	64,01 [62,3; 66,8]			<u>0,00004</u>	351,75 [311,5; 592,5]		
	INT	63,48 [61,6; 64,7]	0,9	0,4	<u>0,0001</u>	440,5 [227,5; 607,75]	0,5	0,5
	PMA	61,3 [59,7; 65,7]	0,4		<u>0,0001</u>	389,75 [247; 672]	0,9	
PAI-1 ПГ/МЛ	PPP	2290,75 [1013; 3355,8]			<u>0,0003</u>	6442 [4659,25; 9307,5]		
	INT	2101,5 [508; 2681,3]	<u>0,01</u>	<u>0,008</u>	<u>0,001</u>	6376,25 [5258,5; 9428,8]	0,6	0,6
	PMA	1328,25 [1044,4; 2157,8]	<u>0,008</u>		<u>0,0002</u>	7956,75 [5332,5; 10645,6]	0,7	
DD МКГ/МЛ	PPP	41,37 [39,5; 44,05]			0,1	45,48 [42,4; 47,2]		
	INT	42,78 [42,2; 44,6]	0,7	0,8	0,7	44,77 [40,5; 46,5]	0,6	0,1
	PMA	43,56 [41,4; 44,3]	0,6		<u>0,02</u>	45,39 [44,5; 47,4]	0,3	

PLS – плазминоген; **tPA** – тканевой активатор плазминогена; **PAI-1** – ингибитор активатора плазминогена 1 типа; **DD** – Д-димер; **PPP** – исходная бедная тромбоцитами плазма; **INT** – бедная

тромбоцитами плазма после инкубации в ней интактных нейтрофилов; **PMA** – бедная тромбоцитами плазма после инкубации в ней индуцированных к нетозу нейтрофилов; **P^{int}** – сравнение INT с PPP внутри групп (по Уилкоксоу); **P^{pma}** – сравнение PMA с PPP внутри групп (по Уилкоксоу); **P^{kz}** – сравнение величины соответствующих показателей между группами контроля и пациентов (U-тест Манна-Уитни); **P¹** – сравнение между INT и PMA внутри группы контроля (по Уилкоксоу); **P²** – сравнение между INT и PMA внутри группы пациентов (по Уилкоксоу). P – значимые отличия ($p \leq 0,05$).

Также выявлены количественные изменения компонентов систем коагуляции и фибринолиза: увеличилось содержание плазминогена/плазмина, фибриногена, а также PSGL-1, уменьшилось – PAI-1 (Таблицы 14, 15, 16). Кроме этого, увеличилось содержание MP-CD142+ (Таблица 13). Колебания концентрации DD и tPA незначимы.

В группе пациентов получены иные результаты при сравнении исходной плазмы (Z.PPP) и модели с нетозом (Z.PMA). В функциональном тесте тромбодинамики зафиксировано уменьшение начальной скорости роста сгустка (V_i), конечного размера (CS) и плотности (D) сгустка (Таблица 11). По динамике фибринолиза данные образцы значимо не отличаются (Таблица 12). Увеличивалась концентрация PSGL-1, уровень P-селектина снижался (Таблица 16). При этом увеличение концентрации компонентов систем коагуляции и фибринолиза, а также MP-CD142+ было незначимо (Таблицы 14-16).

Для того чтобы из полученных отличий вычленили те, что обусловлены преимущественно нетозом, но не присутствием в плазме и жизнедеятельностью НГ как таковых, на следующем этапе выполняли сравнение образцов исходной плазмы внутри каждой группы (K.PPP и Z.PPP) с образцами плазмы после инкубации в ней интактных НГ (K.INT и Z.INT), а также сравнили последние с моделью нетоза в группе контроля и в группе пациентов (K.PMA и Z.PMA).

Так в контроле (K.INT) наблюдалось ускорение роста сгустка (V_{st}) и ускорение появления спонтанных сгустков (T_{sp}) относительно исходной плазмы (K.PPP). Незначимо увеличилась динамика лизиса (LP) и сократилось время полного лизиса сгустка (LTE) (Таблица 12). Количественное определение

участников коагуляции и фибринолиза выявило значимое относительно исходной плазмы увеличение содержания PLS, PAI-1, Fib и PSGL-1 (Таблицы 14-16). Незначимо колебались уровни MP-CD142+, факторов IX и XIII, протромбина, DD и tPA, TF и P-селектина (Таблица 15, 16). По ряду показателей образцы K.INT и/или K.PMA не отличаются от исходной плазмы, но при этом различаются между собой: стационарная скорость роста сгустка (Vst), плотность сгустка (D) и содержание фибриногена выше в образцах K.INT относительно как исходной плазмы, так и K.PMA; изменение динамики лизиса (LP), времени полного лизиса сгустка (LTE) и количества MP-CD142+ максимально в образцах K.PMA.

Таблица 15

Концентрация некоторых компонентов свертывающей и антикоагулянтной систем крови Me[Q0,25-Q0,75]

	К. Группа контроля			PKZ		Z. Группа пациентов		
		Значение показателя	P ^{int} P ^{pma}	P ¹		Значение показателя	P ^{int} P ^{pma}	P ²
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Fib мкг/мл	PPP	1949,3 [1761,5; 2453,3]		<u>0,01</u>		4244,3 [245,8; 6001,6]		
	INT	2882,7 [1877,3; 3142,6]	<u>0,02</u>	0,9	<u>0,04</u>	3203,4 [2749,6; 6229,9]	0,4	0,6
	PMA	2355,8 [1745; 3206,6]	<u>0,05</u>		0,08	3384,7 [2723,7; 8997]	0,8	
IX пг/мл	PPP	6442,75 [5512,5; 8634,6]		<u>0,00004</u>		14245,5 [12379; 19038,5]		
	INT	6820 [6726,8; 8156,5]	0,4	0,7	<u>0,02</u>	13857 [10439,3; 16114,5]	0,3	0,8
	PMA	6517,8 [5702,2; 7290,6]	0,4		<u>0,004</u>	10840 [8315; 20322,8]	0,3	

Таблица 15. Продолжение

1	2	3	4	5	6	7	8	9
XIII МКГ/МЛ	PPP	3,62 [3,2; 4]		0,5		3,68 [3,53; 4,04]		
	INT	3,74 [3,4; 4,2]	0,3	0,4	0,4	3,57 [3,48; 3,92]	0,2	0,4
	PMA	3,8 [3,3; 4,3]	0,7		0,7	3,72 [3,23; 4,02]	0,2	
PT МКГ/МЛ	PPP	23,3 [20,4; 41,7]		0,6		27,4 [22,5; 35,9]		
	INT	18,4 [14,7; 45,3]	0,9	0,1	0,1	32,2 [24,4; 45,3]	0,5	0,3
	PMA	32,4 [17,8; 49,7]	0,5		0,6	29,2 [23,3; 46]	0,5	
TF ПГ/МЛ	PPP	4,45 [4,29; 4,49]		0,6		4,48 [4,23; 4,7]		
	INT	4,39 [4,26; 4,51]	0,8	0,9	0,3	4,54 [4,32; 4,67]	0,5	0,2
	PMA	4,44 [4,32; 4,55]	0,8		0,06	4,59 [4,43; 4,77]	0,2	
AT-III МКГ/МЛ	PPP	998,8 [799,4; 1791,3]		0,6		1272 [996,2; 1753]		
	INT	956 [732,2; 2519,7]	0,9	0,7	0,7	1356,6 [978,2; 1600]	0,9	0,7
	PMA	744,9 [739,5; 2226,7]	0,8		0,8	1170,8 [967,7; 1894,4]	0,8	

Fib – фибриноген; **IX** – фактор свертывания крови IX; **XIII** – XIII фактор свертывания крови; **PT** – протромбин; **TF** – тканевой фактор; **AT III** – антитромбин-III, мкг/мл; **PPP** – исходная бедная тромбоцитами плазма; **INT** – бедная тромбоцитами плазма после инкубации в ней интактных нейтрофилов; **PMA** – бедная тромбоцитами плазма после инкубации в ней индуцированных к нетозу нейтрофилов; **P^{int}** – сравнение INT с PPP внутри групп (по Уилкоксоу); **P^{pma}** – сравнение PMA с PPP внутри групп (по Уилкоксоу); **P^{kz}** – сравнение величины соответствующих показателей между группами контроля и пациентов (U-тест Манна-Уитни); **P¹** – сравнение между INT и PMA внутри группы контроля (по Уилкоксоу); **P²** – сравнение между INT и PMA внутри группы пациентов (по Уилкоксоу). P – значимые отличия (**p≤0,05**).

Таким образом в группе контроля и интактные и индуцированные к нетозу НГ способны влиять на коагулологические характеристики аутоплазмы, однако это влияние не одинаково. В тесте тромбодинамики отличия между образцами К.ИИТ и К.РМА зафиксированы по показателям скорости роста (V_{st}), плотности сгустка (D), динамики лизиса (LP), времени лизиса сгустка (LTE) (Таблица 12). Кроме этого, указанные образцы отличаются по содержанию MP-CD142+, плазминогена/плазмина и PAI-1. Для части показателей эти различия обусловлены прогрессивным увеличением или снижением его значения в ряду исходная плазма – плазма с интактными НГ – плазма с активированными НГ. Эту закономерность можно продемонстрировать на примере динамики лизиса сгустка (LP): она минимальна в исходной плазме, увеличивается после инкубации с интактными НГ и увеличивается ещё больше в плазме после инкубации с активированными НГ. Аналогичный механизм формирования отличий отмечен также для T_{sp} , LTE , ИЛ-8, MP-142+, PLS, PSGL-1. Для ряда показателей подобная линейная динамика не характерна и отличия между плазмой с интактными и активированными НГ обусловлены разнонаправленным изменением значения измеряемой величины в соответствующих образцах (например, V_{st} , фибриноген, PS). Однако, учитывая общую тенденцию, образцы К.РМА представляют собой крайнюю степень выраженности изменений, намеченных в плазме К.ИИТ – незначительное замедление роста сгустка как следствие – уменьшение его размера, а также интенсификацию фибринолиза.

Несколько иная картина наблюдается у пациентов. Образцы Z.ИИТ значимо отличаются от исходной плазмы только за счет уменьшения начальной скорости роста сгустка (V_i), а также увеличения PSGL-1 и ИЛ-8. При сравнении Z.ИИТ и Z.РМА значимо уменьшаются размер сгустка (CS) и его плотность (D), при увеличении времени задержки роста (T_{lag}) в плазме с активированными клетками. Изменение концентрации отдельных компонентов систем коагуляции и фибринолиза, при этом, в целом совпадает с тенденцией в группе контроля, когда наблюдается изменение величины параметра в ряду Z.PPP-Z.ИИТ-Z.РМА, однако

эти сдвиги незначительны, что говорит о слабом ответе НГ на стимулятор, подтверждением чего, также может служить меньшее увеличение уровня вкДНК у больных (Z.PMA).

Таблица 16

Концентрация цитокинов и растворимых рецепторов в группах контроля и пациентов Me[Q0,25-Q0,75]

	К. Группа контроля				PKZ	Z. Группа пациентов		
		Значение показателя	P ^{int} P _{PMA}	P ¹		Значение показателя	P ^{int} P _{PMA}	P ²
ИЛ-6 пг/мл	PPP	59,96 [59,2; 64,18]			<u>0,04</u>	65,73 [64,5; 68,9]		
	INT	65,62 [63,3; 67,81]	0,09	<u>0,05</u>	0,7	66,79 [63,2; 67,5]	0,6	0,4
	PMA	61,33 [59,92; 62,81]	0,7		<u>0,004</u>	67,78 [65,6; 286]]	0,5	
ИЛ-8 пг/мл	PPP	60,24 [57,9; 140,5]			<u>0,03</u>	571,75 [249,5; 1243]		
	INT	2422 [880,8; 4852,5]	<u>0,008</u>	<u>0,007</u>	<u>0,7</u>	3150,75 [2007; 5470,8]	<u>0,004</u>	0,6
	PMA	7836,25 [5422,5; 10786,5]	<u>0,008</u>		<u>0,07</u>	1677 [1006,8; 7777]	<u>0,02</u>	
P-селектин пг/мл	PPP	43,09 [41; 44,3]			<u>0,04</u>	46,03 [42,84; 47,49]		
	INT	41,88 [40,1; 44,9]	0,5	0,7	<u>0,05</u>	44,77 [41,97; 46,42]	0,08	0,6
	PMA	43,12 [39,06; 43,81]	0,8		0,4	45,39 [40,88; 46,83]	<u>0,01</u>	
PSGL-1 пг/мл	PPP	457,75 [227,5; 584,8]			0,4	531,48 [349,5; 672,8]		
	INT	865 [620,5; 1018,75]	<u>0,02</u>	<u>0,01</u>	0,3	781,25 [431,8; 926,5]	<u>0,04</u>	0,2
	PMA	1236,75 [1071,25; 1340,5]	<u>0,008</u>		<u>0,05</u>	791,5 [538,8; 1254,3]	<u>0,002</u>	

ИЛ-6 – интерлейкин-6; **ИЛ-8** – интерлейкин-8; **Р-селектин** – Р-селектин; **PSGL-1** – Р-селектин-гликопротеинлиганд-1; **PPP** – исходная бедная тромбоцитами плазма; **INT** – бедная тромбоцитами плазма после инкубации в ней интактных нейтрофилов; **PMA** – бедная тромбоцитами плазма после инкубации в ней индуцированных к нетозу нейтрофилов; **P^{int}** – сравнение INT с PPP внутри групп (по Уилкоксоу); **P^{pma}** – сравнение PMA с PPP внутри групп (по Уилкоксоу); **P^{kz}** – сравнение величины соответствующих показателей между группами контроля и пациентов (U-тест Манна-Уитни); **P¹** – сравнение между INT и PMA внутри группы контроля (по Уилкоксоу); **P²** – сравнение между INT и PMA внутри группы пациентов (по Уилкоксоу). P – значимые отличия ($p \leq 0,05$).

3.2.4. Результаты корреляционного анализа

Для выявления связи между показателями функционального теста тромбодинамики с полученным уровнем компонентов гемостаза, мы провели корреляционный анализ в обеих группах (Таблицы 17 и 18).

В пробах с нетозом в группе контроля (К.PMA) выявлена ассоциация скорости роста с размером сгустка и его плотностью – увеличение скорости роста сопровождается увеличением размера сгустка и уменьшением его плотности. При этом появляется обратная связь V_i с повышенным уровнем вкДНК и ИЛ-6, иными словами, высокая концентрация вкДНК и ИЛ-6 ассоциирована с замедлением начального этапа коагуляции. В целом концентрация вкДНК имеет положительную корреляцию с показателем плотности сгустка и временем задержки роста, и обратную – со скоростью роста и размерами сгустка, а также концентрацией плазминогена (PLS) (Таблица 17).

У пациентов в образцах плазмы после инкубации с индуцированными НГ (Z.PMA) обращает на себя внимание отрицательная ассоциация начальной скорости роста с уровнем вкДНК и положительная – с уровнем ИЛ-8. Также высоким количеством вкДНК наблюдается также увеличение содержания tPA и PAI-1 (Таблица 20).

Таблица 17

Корреляционные связи между показателями теста тромбодинамики и содержанием компонентов систем коагуляции и фибринолиза в образце плазмы после нетоза в группе контроля

K.PMA		Vi	Vst	CS	D	Tlag	LP	LTE
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Vi	r_s	1	0,467	0,767	-0,550	-0,838	0,731	-0,467
	p		0,205	0,016	0,125	0,005	0,025	0,205
Vst	r_s	0,467	1	0,867	-0,383	-0,385	0,168	-0,600
	p	0,205		0,002	0,308	0,307	0,666	0,088
CS	r_s	0,767	0,867	1	-0,650	-0,667	0,555	-0,717
	p	0,016	0,002		0,058	0,050	0,121	0,030
Tlag	r_s	-0,838	-0,385	-0,667	0,547	1	-0,474	0,436
	p	0,005	0,307	0,050	0,127		0,197	0,241
LP	r_s	0,731	0,168	0,555	-0,790	-0,474	1	-0,420
	p	0,025	0,666	0,121	0,011	0,197		0,260
LTE	r_s	-0,467	-0,600	-0,717	0,633	0,436	-0,420	1
	p	0,205	0,088	0,030	0,067	0,241	0,260	
вКДНК	r_s	-0,817	-0,150	-0,517	0,633	0,624	-0,840	0,317
	p	0,007	0,700	0,154	0,067	0,072	0,005	0,406
PLS	r_s	0,617	0,500	0,683	-0,700	-0,299	0,790	-0,567
	p	0,077	0,170	0,042	0,036	0,434	0,011	0,112
ИЛ-6	r_s	-0,533	-0,733	-0,750	0,417	0,342	-0,462	0,233
	p	0,139	0,025	0,020	0,265	0,368	0,210	0,546

r_s – коэффициент корреляции; p – значимые корреляции

Таблица 18

Корреляционные связи между показателями теста тромбодинамики и содержанием компонентов систем коагуляции и фибринолиза в образце плазмы после нетоза в группе пациентов

Z.PMA		Vi	Vst	CS	D	Tsp	Tlag	LP	LTE
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Таблица 18. Продолжение

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Vi	r_s	1	0,644	0,071	-0,060	-0,795	-0,116	0,237	-0,245
	p		0,005	0,786	0,819	0,000	0,658	0,360	0,343
Vst	r_s	0,644	1	-0,182	0,263	-0,725	0,324	0,646	-0,750
	p			0,005	0,485	0,308	0,001		
CS	r_s	0,071	-0,182	1	-0,600	0,119	-0,428	-0,689	0,471
	p	0,786	0,485		0,011	0,649	0,087		0,002
Tlag	r_s	-0,116	0,324	-0,428	0,764	-0,069	1	0,424	-0,313
	p	0,658	0,205	0,087	0,000	0,792		0,090	0,221
LP	r_s	0,237	0,646	-0,689	0,517	-0,422	0,424	1	-0,907
	p	0,360	0,005	0,002	0,034	0,092	0,090		0,000
LTE	r_s	-0,245	-0,750	0,471	-0,360	0,499	-0,313	-0,907	1
	p	0,343	0,001	0,057	0,155	0,041	0,221		
вкДНК	r_s	-0,519	-0,319	-0,069	-0,169	0,255	-0,045	-0,118	-0,022
	p	0,033	0,212	-0,069	0,516	0,323	0,863	0,653	0,933
ИЛ-6	r_s	0,164	0,295	-0,069	0,078	-0,044	0,099	0,569	-0,456
	p	0,529	0,251	-0,069	0,765	0,866	0,704	0,017	0,066
ИЛ-8	r_s	0,622	0,274	-0,069	-0,262	-0,400	-0,383	-0,142	0,037
	p	0,008	0,288	-0,069	0,309	0,112	0,130	0,586	0,889

r_s – коэффициент корреляции; p – значимые корреляции

Учитывая вышеприведенные данные, наиболее важными результатами исследования в группе контроля можно считать выраженную, ассоциированную с нетозом, интенсификацию лизиса фибрина, а также локальное увеличения уровня ИЛ-8 в сравнении с исходной плазмой и образцами с интактными НГ. У пациентов выявлена исходно значительно более высокая чем в контроле концентрация факторов свертывания I и IX, компонентов фибринолитической системы – tPA, PLS и PAI-1, а также ИЛ-8. При этом нетоз в использованной модели не оказал значимого влияния на скорость фибринолиза и концентрацию основных плазменных участников данного процесса. В обеих группах выявляется влияние

нетоза на начальный этап коагуляции (V_i), выражающийся в уменьшении скорости инициации роста сгустка и удлинении времени задержки роста (Tlag).

ГЛАВА 4. Обсуждение полученных результатов

Очевидно, что полученные результаты свидетельствуют о сложных и нелинейных взаимодействиях исследованных параметров. Кроме этого, для лучшего понимания стоит разграничить понятия нетоза – как процесса формирования НВЛ, т.е. одного из возможных вариантов активности клетки и собственно НВЛ – как конкретную многокомпонентную структуру. При этом влияние нетоза, как комплексного процесса, вероятно, может отличаться от влияния изолированной НВЛ как совокупности ДНК и гистоновых белков. Приведенное выше положение подтверждается экспериментальными работами, где *in vitro* оценивают взаимодействие отдельных изолированных компонентов НВЛ (нуклеосомы, олигонуклеотиды, белки-гистоны) с плазменными и/или клеточными участниками процессов фибринообразования и фибринолиза [60, 63, 76]. Также, принципиальное значение имеют условия эксперимента [4, 17, 18]. Очевидно, возможны различные результаты экспериментов проведенных в культуральной среде и в плазме, на поверхности эндотелия или в лабораторной посуде, в проточной или стационарной системе, при разном времени экспозиции, виде и количестве задействованных клеток. Что говорит о значительной комплексности изучаемого явления. Усложняет анализ также и тот факт, что многие участники являются не просто белками, но ферментами, для всесторонней оценки функции которых, необходимы знания не только их концентрации, но и активности, при этом указанные характеристики зачастую связаны нелинейно. В связи с этим, представляется оправданным проведение различных по своему дизайну экспериментальных работ, что при сопоставлении их результатов между собой, позволит постепенно воссоздать подробную модель изучаемого процесса.

В представленной работе принципиальная схема экспериментальной модели включает в себя 2 компонента: бедную тромбоцитами плазму и нейтрофильные гранулоциты, при этом плазма одинакова в каждом образце, клеток же два варианта – интактные и активированные. Соответственно было получено 3 варианта работы системы коагуляции и фибринолиза, в зависимости от состояния клеточного компонента. Первый вариант – плазма без клеток, отражает исходное функционирование системы гемостаза, второй вариант – плазма, содержащая интактные клетки – показывает влияние на неё жизнедеятельности НГ в состоянии покоя, третий вариант – плазма с активированными клетками – воссоздает процесс нетоза и демонстрирует возможное его влияние на свертывание крови и последующий фибринолиз. По истечении времени инкубации интактные клетки находились в виде суспензии, в то время как активированные – представляли собой единый конгломерат фрагментов оставшихся после разрушения клеток, что служило также одним из показателей успешности индукции нетоза и гарантировало контакт внутриклеточных компонентов с плазмой.

На предварительном этапе исследования в тесте тромбодинамики было показано, и на основном этапе подтверждено, что влияние нетоза процесс коагуляции плазмы возможно в том числе и при удалении путем центрифугирования, из образца значительной части сформированных ДНК-сетей. При этом параметром, который стабильнее всего изменялся при данных условиях эксперимента, была начальная скорость роста сгустка (V_i). Таким образом было зафиксировано незначительное замедление фибринообразования на начальном этапе – при контакте опытного образца плазмы с активатором. Учитывая, что активатором коагуляции в данном методе является тканевой фактор, есть основание предполагать, что процесс нетоза повлиял на состояние компонентов внешнего пути свертывания крови, процесс перехода фибриногена в фибрин и/или на антикоагулянтную систему. Согласно литературным данным продукция НВЛ приводит к протеолитической деградации TFPI [45, 76, 137, 79], что приводит к активации коагуляции по внешнему пути, однако, упомянутый выше активатор, содержит ТФ в избытке, что, вероятно, нивелирует как колебания специфического

его ингибитора, так и отличия в содержании ТФ в объеме исследованной плазмы. Кроме V_i фазу инициации тромбообразования характеризует $Plag$ – время от контакта активатора с плазмой до момента появления первых порций фибрина. В основной части исследования получено значимое удлинение задержки, свидетельствующее о том, что замедление роста сгустка в начальной фазе связано не с содержанием ТФ и его ингибитора, но, более вероятно – с замедлением образования тромбина и/или с этапом превращения фибриногена в фибрин. Согласно данным корреляционного анализа высокое содержание вкДНК (наблюдаемое в пробах с нетозом) так же ассоциировано с более длительной задержкой роста и низкой начальной скоростью роста (Таблицы 17 и 18). Данные литературы, описывающие тромбогенные свойства НВЛ, связывают данное их свойство с протеолизом TFPI и со способностью нуклеосом вызывать коагуляцию через активацию фактора Хагемана [105] и через активацию тромбоцитов [137]. Учитывая отсутствие тромбоцитов в представленной экспериментальной модели, и использование тканевого тромбопластина в качестве индуктора фибринообразования, нет оснований связывать полученное в тесте тромбодинамики удлинение начального этапа коагуляции с модуляцией активности тромбоцитов или состоянием внутреннего пути, что также дает основание рассматривать момент взаимодействия тромбина и фибриногена, как на наиболее вероятный этап, с которым связано увеличение параметра V_i [17, 18]. Дополнительно к этому, в исследовании T. Damiana с соавторами (2020 год) показано, что фермент PAD4 может осуществлять цитруллирование не только гистона H3, но и фибриногена, при этом достоверно неизвестно как это влияет на его конечные свойства, но теоретически может изменять трансформацию его в нерастворимый фибрин или же полимеризацию [49, 167]. Принимая во внимание исходно повышенный уровень фибриногена у пациентов, и, вероятно измененную его морфологию, на фоне снижения уровня TFPI, можно ожидать ускорения тромбообразования по внешнему пути, что приведет к увеличению генерации фибринопептидов А и В, выступающих на данном этапе в качестве антитромбинов, что, в конечном итоге привело к некоторому начальному замедлению коагуляции,

зафиксированному в тесте тромбодинамики как снижение скорости V_i и удлинение задержки роста фибринового сгустка $Plag$. Данное предположение, таким образом, не противоречит литературными данными, констатирующими прокоагулянтные свойства НВЛ.

После контакта плазмы с активатором и появления первых порций фибрина, рост сгустка замедляется и стабилизируется на относительно постоянном уровне. Эту фазу характеризует параметр V_{st} – скорость распространения роста, чувствительный к содержанию компонентов как внешнего, так и внутреннего путей, активности антикоагулянтов и концентрации микровезикул в плазме. В контроле было выявлено ускорение скорости распространения роста, что вероятнее всего связано с увеличением вкДНК в плазме относительно исходного образца и в сравнении с аналогичными образцами у пациентов, и связанной этим дополнительной активации коагуляции через фактор Хагемана [107]. В группе онкобольных не отмечено существенного влияния нетоза на данный параметр, вероятно, в виду исходно повышенной активности внутреннего пути, о чем свидетельствует высокий уровень фактора IX (Таблица 15) и меньшей степени нарастания содержания вкДНК и микровезикул в соответствующих образцах плазмы. Связь увеличения скорости распространения роста с изменением содержания вышеуказанных компонентов подтверждает и параметр времени появления спонтанных сгустков (T_{sp}) – очагов коагуляции, непосредственно не связанных с активатором. Он является показателем присутствия в плазме активных факторов свертывания, тканевого фактора, микровезикул и прочих компонентов необходимых для фибринообразования и являющихся показателем состояния гиперкоагуляции. При этом в плазме доноров исходно спонтанного тромбообразования не зарегистрировано ранее 45 минуты исследования в отличие от больных, где состояние гиперкоагуляции выражается не только в высокой скорости фибринообразования, но и в значительно более раннем формировании спонтанных сгустков (на 19 минуте регистрации). При этом процесс нетоза, в использованной модели, значимо не повлиял на собственный прокоагулянтный потенциал плазмы у пациентов, в связи с отсутствием значимого нарастания

микровезикуляции (Таблица 13) и менее значительным выходом нуклеосом в плазму в сравнении с контролем, где нарастание содержания вкДНК и усиление продукции микрочастиц сопровождается более ранним формированием спонтанных сгустков. Вероятно, именно на ускорении стационарного фибринообразования, основана прокоагулянтная сторона нетоза, широко описываемая в литературе (помимо активации тромбоцитов, ещё более повышающей тромбогенный потенциал изучаемого процесса). При этом, регистрируемая в данном эксперименте, начальная задержка фибринообразования, парадоксально отражает ускорение генерации тромбина по внешнему пути [17, 18, 20]. В целом, предлагаемое нами обоснование обоих параметров скорости коагуляции, укладывается в существующую парадигму влияния нетоза на систему гемостаза, однако дополняет и уточняет её механизмы.

Размер фибринового сгустка (CS) прямо зависит от скорости его роста – чем больше скорость, тем больше конечный размер. В контроле CS уменьшился незначительно, вероятно, за счет вышеописанного замедления начальной скорости. Однако в группе больных, уменьшение конечного размера фибринового сгустка более существенное и объясняется не столько задержкой и замедлением роста на начальном этапе, но более активным и ранним чем в контроле фибринолизом. С одной стороны высокая скорость роста обеспечивает быстрое увеличение размера сгустка по сравнению с аналогичным периодом времени в контроле, но с другой – более ранний и интенсивный фибринолиз не позволяет сгустку продолжать увеличиваться в размерах, он начинает растворяться, и к моменту автоматической регистрации размера теряет некоторый процент своей площади. Данный факт подтверждается как визуальным контролем (Рисунки 6 и 7), так и данными предварительного этапа, где проводилось исследование фибринообразования без фибринолиза и рост сгустка продолжался от активации до окончания исследования, в связи с чем конечный CS фиксировался больший чем в данной основной версии исследования (Таблицы 4 и 7).

Параметр плотности сгустка (D) отражает содержание фибриногена и работу фактора XIII, осуществляющего полимеризацию нерастворимого фибрина.

Снижение плотности, наблюдаемое в группе пациентов, при исследовании образцов Z.PMA дает основание связать изменение данного параметра с более ранним и активным фибринолизом, аналогично уменьшению размера сгустка, при этом корреляционный анализ, демонстрирующий отсутствие связи плотности сгустка со скоростью его роста и колебанием концентрации факторов свертывания крови, свидетельствует в пользу данного предположения. Кроме этого, нельзя исключить, что цитруллирование фибриногена может дополнительно влиять на устойчивость фибрина к действию специфических и неспецифических протеаз.

Таким образом представленный вариант исследования влияния нетоза выявляет значительное изменение фибринолитического потенциала исследованных образцов плазмы в зависимости от интенсивности продукции НВЛ. Интенсификация фибринолиза отмечена ещё на предварительной стадии, в пробах с ФП. Простой тест позволил продемонстрировать наличие этого эффекта и максимальную его выраженность именно в образцах с нетозом.

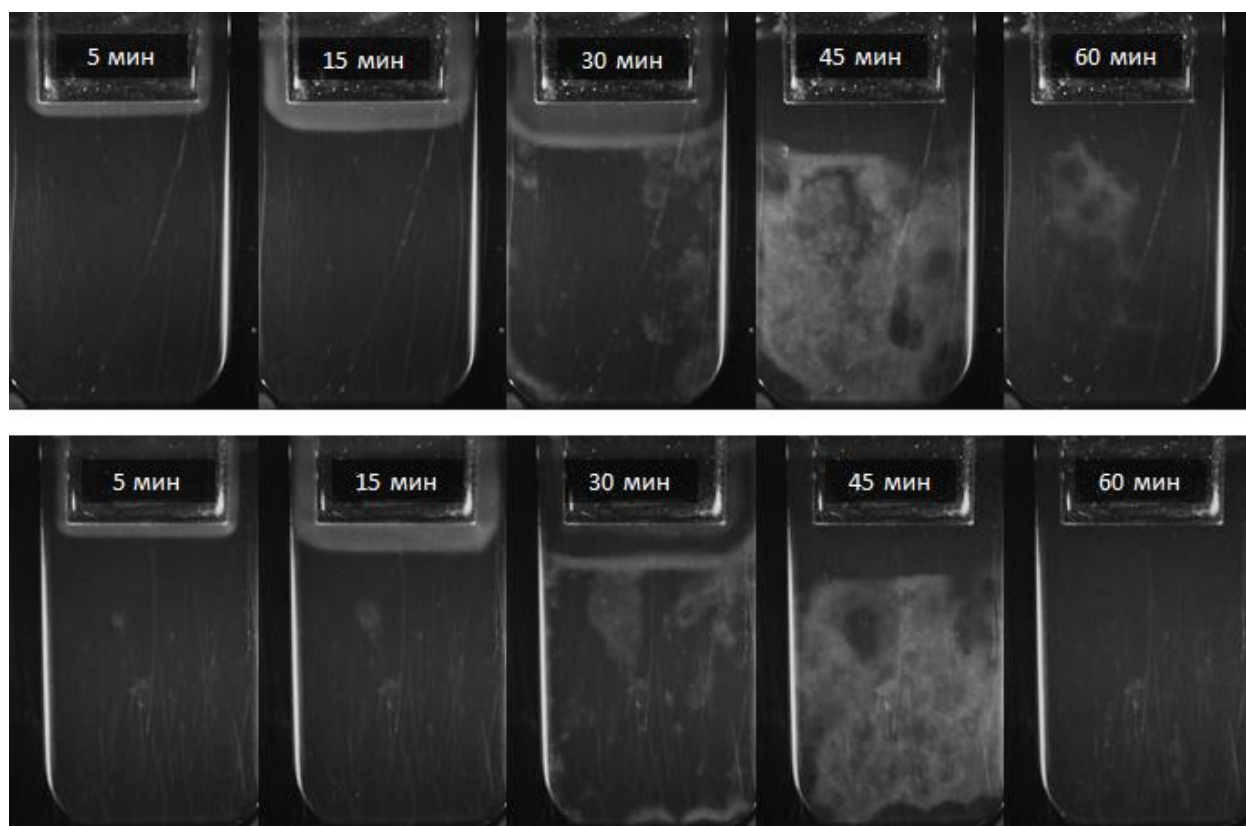


Рисунок 7. Регистрация тромбодинамики в группе контроля. Верхний ряд демонстрирует запись исследования образца K.INT, нижний ряд – K.PMA.

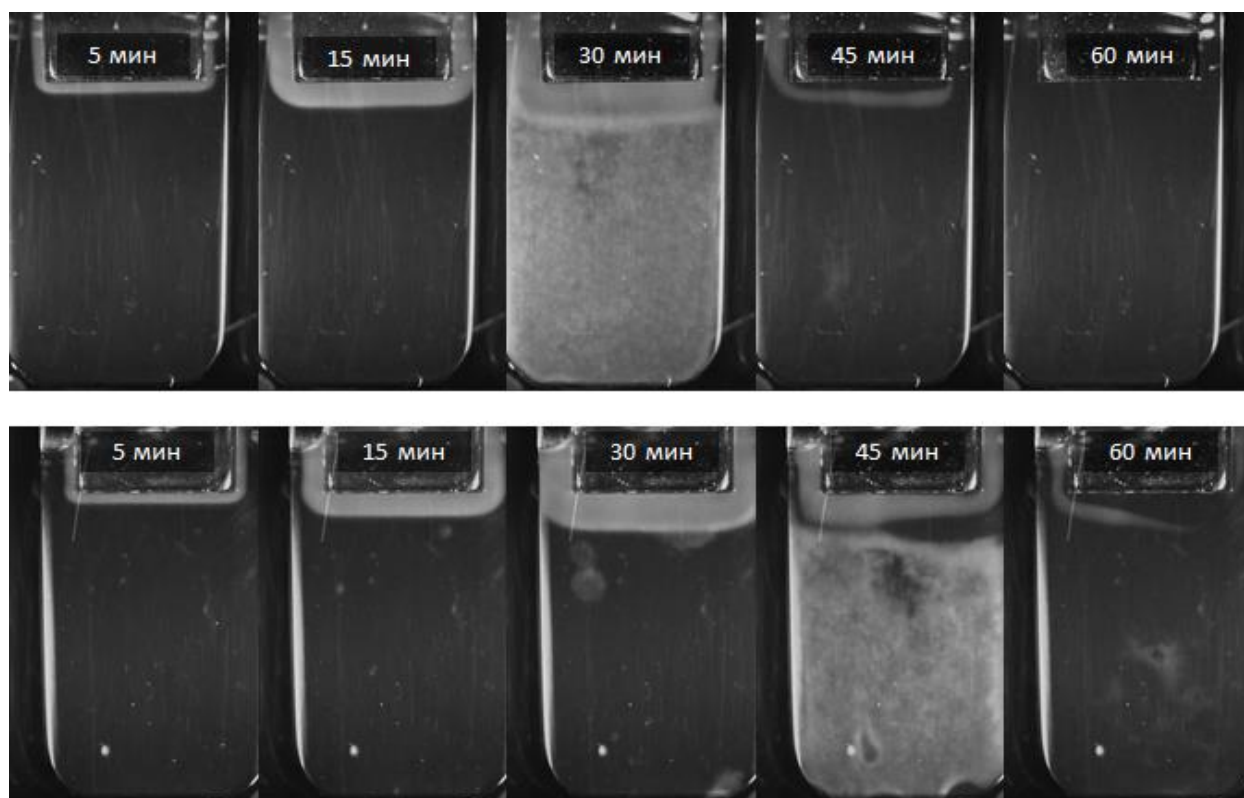


Рисунок 8. Регистрация тромбодинамики в группе пациентов. Верхний ряд демонстрирует запись исследования образца Z.INT, нижний ряд – Z.PMA.

Расширенный тест тромбодинамики, позволил оценить процесс фибринолиза по трем параметрам: времени начала лизиса (LOT), динамике лизиса (LP) и времени необходимому для полного лизиса сгустка (LTE). Ожидается наблюдаться более отсроченный фибринолиз в группе контроля и раннее начало лизиса у пациентов, что подкреплено и измерением концентрации ключевых участников данного процесса. Исходное содержание PLS, tPA и PAI-1 в плазме крови больных значительно превышает показатели группы контроля, что свидетельствует о высоком протеолитическом потенциале и обеспечивает быструю инициацию лизиса, высокую его скорость и как следствие короткое время необходимое для полного растворения сгустка. Тест с фибриновыми пластинами при этом показал и то, что для процесса фибринолиза необязательно присутствие специфических ферментов – плазминогена и его активатора, а также возможность неспецифического фибринолиза, основанного на высоком протеолитическом потенциале непосредственно НГ (металлопротеиназы и прочие ферменты ПМЯЛ

при остром и хроническом воспалении участвуют в ремоделировании внеклеточного белкового матрикса). Пробы с ингибитором протеиназ апротинином подтверждают версию о протеолитической сущности лейкофибринолиза, в том числе неспецифического, что показано в пробах с прогретыми ФП, где использованная суспензия клеток позволила оценить собственно клеточную фибринолитическую активность НГ и исключала дополнительное влияние плазменной системы фибринолиза. Сравнение динамики показателей фибринолитического потенциала образцов внутри групп контроля и пациентов демонстрирует максимальное его значение в пробах с нетозом. Корреляционный анализ результатов исходных и опытных образцов в группе контроля дает основание предположить ассоциацию повышенной динамики лизиса с наличием признаков воспаления, о чем можно судить по наличию положительной корреляционной связи данного показателя с уровнем ИЛ-6, PSGL-1 и фибриногена. Указанные вещества свидетельствуют о провоспалительном фоне, который помимо цитокинового выражения проявляется и повышением протеолитического потенциала плазмы крови. Выполненное на предварительном этапе измерение уровня НЭ в исследованных образцах плазмы выявило снижение её концентрации в образцах с интактными НГ и отсутствие увеличения – в образцах с нетозом, что, однако, не отменяет результатов лизиса фибриновых пластин, и объясняется, во-первых, использованием в пробе с ФП суспензии клеток, тогда как концентрация НЭ определялась в плазме, во-вторых, отсутствием прямой связи между концентрацией фермента и его активностью. В плазме крови также возможно влияние ингибиторов протеолитических ферментов, чего не будет наблюдаться при использовании суспензии НГ в культуральной среде. Кроме того, лизис ФП осуществлялся при участии не только НЭ, но и прочих протеаз нейтрофилов, как непосредственно, так и через работу tPA, источником которого являются в том числе и сами НГ. У пациентов значение НЭ несколько выше, чем в контроле, но после нетоза также не наблюдается заметного её увеличения. В то же время концентрация tPA у больных выше более чем в 2 раза, что наряду с повышенным уровнем плазминогена обеспечивает значительно более выраженный фибринолиз

по сравнению с контролем даже при одинаковом уровне НЭ. Обращает на себя внимание отсутствие значимой разницы концентраций DD в исходных образцах плазмы доноров и пациентов, что странно при высокой концентрации ферментов фибринолитической системы, но вероятно указывает на преобладание фибринообразования над фибринолизом, являющееся следствием активности его ингибиторов. Другой особенностью фибринолиза у больных является значительно менее выраженная разница в LP и LTE между образцами плазмы с интактными и активированными нейтрофилами. В контроле увеличение динамики лизиса привело к сокращению продолжительности полного лизиса сгустка на 5 минут, в то время как у пациентов незначимые колебания динамики LP практически не повлияли на время полного растворения фибрина. При сопоставлении данных теста тромбодинамики с результатами лизиса ФП, также возможно проследить, что разница площадей лизиса в контроле больше, чем у пациентов. Это говорит о, вероятно, более высокой активности интактных НГ у больных, нивелирующей разницу с активированными НГ, а также косвенно подтверждает более выраженный эффект ингибиторов фибринолиза у больных, что заметнее в тесте тромбодинамики и не очевидно на ФП. При этом в контроле наблюдалось уменьшение концентрации PAI-1 в плазме с активированными НГ, что в целом укладывается в логику процесса фибринолиза у доноров. В группе пациентов значимого уменьшения данного компонента не наблюдалось, что, потенциально, стало причиной отсутствия значимого ускорения фибринолиза в образцах плазмы, контактировавших с НВЛ. Маловероятно, что данная особенность является специфичной именно для нетоза, но скорее отражает иное функционирование системы фибринолиза у онкобольных, при этом процесс формирования НВЛ в использованной экспериментальной модели, не изменил эту закономерность. Анализируя динамику растворения фибрина у здоровых доноров и онкобольных лиц, необходимо учитывать большую концентрацию фибриногена у пациентов, которая обеспечивает формирование более плотного сгустка, что также затрудняет и замедляет его лизис.

Стоит также заметить, что наличие двух возможных путей нетоза литического («смертельного») и «прижизненного» может быть объяснением избыточного тромбообразования при хронических заболеваниях в том числе и при онкологических процессах. «Прижизненный» нетоз предполагает не полное разрушение НГ, но лишь экзоцитоз хроматина и некоторых цитоплазматических компонентов, не создается избытка протеолитических ферментов или их активность нивелируется антипротеазами плазмы крови, и баланс смещается в сторону гиперкоагуляции без выраженного фибринолиза. Литический нетоз, напротив, способствует массивному выходу протеаз в плазму крови и наряду с активным тромбообразованием наблюдается и быстрый лизис сгустков. Вероятным представляется сценарий развития хронической гиперкоагуляции, сопряженной с «прижизненным» нетозом, и острых процессов, например сепсиса, ассоциированных с избыточным ответом НГ, в том числе гибелью путем литического нетоза [152]. Таким образом при хронических воспалительных заболеваниях поддерживается длительная подпороговая стимуляция НГ, происходит их избыточная, но постепенная гибель путем «прижизненного» нетоза, что и является одним из факторов способствующих гиперкоагуляции – за счет способности гистонов индуцировать активацию эндотелиоцитов, активацию и агрегацию тромбоцитов, а также стимуляцию синтеза гепатоцитами факторов свертывания (II, V, VII, IX), что было показано в работе A. de Los Reyes-Garcia с соавторами (2016 год). Кроме того, указанное выше исследование демонстрирует и связь инфекционных и/или асептических воспалительных процессов с состоянием гиперкоагуляции [111, 126]. В случае острых инфекционных заболеваний или обострения хронических воспалительных процессов, надпороговая стимуляция запускает гибель НГ путем «литического» нетоза с увеличением риска развития местной (например, эрозия атеросклеротической бляшки, увеличение зоны поражения при аутоиммунных процессах и т.п.) или генерализованной коагулопатии. При этом чем более здоровым был организм до получения стимула в виде острой инфекции или травмы, тем более сильный ответ на раздражитель можно ожидать. Однако, в ситуации длительного и относительно

вялотекущего воспаления, ответ истощенных клеток организма на внезапный сильный раздражитель может быть выражен слабее.

Вышесказанное подтверждается и различием групп контроля и пациентов по силе ответа клеток на активатор. Об этом можно судить по разнице между показателями проб с интактными и стимулированными клетками, например по уровню микровезикуляции (Таблица 13), а также степени изменения продукции цитокинов и сброса мембранных рецепторов. Так в контроле концентрация специфичного для НГ цитокина – ИЛ-8 прогрессивно увеличивался в ряду «исходная плазма–плазма с интактными НГ–плазма с активированными НГ», в то время как у пациентов исходно более высокий чем в контроле его уровень, увеличился в плазме с интактными клетками, но в образцах с нетозом отсутствуют значимые отличия, что в свою очередь говорит об отсутствии внутриклеточного запаса данного цитокина. PSGL-1, следующий показатель степени активации клеток, в контроле в максимальной концентрации определяется в образцах с нетозом. При этом у больных пробы с интактными и активированными НГ не отличаются по уровню данного рецептора. Из вышесказанного можно сделать вывод о различном ответе НГ доноров и онкобольных на стимуляцию и, вероятно, разной степени продукции НВЛ. НГ пациентов изначально достаточно активированы, в связи с чем различия между ними и стимулированными НГ не так выражены, как у здоровых лиц. В работе S.T. Abrams с соавторами (2020 год) также продемонстрирована прямая связь между уровнем формирования НВЛ, концентрацией ИЛ-8 и тяжестью расстройств коагуляции, а также эффективность применения антител против ИЛ-8 и/или, участвующих во внутриклеточном проведении сигнала от рецептора ИЛ-8, в отношении профилактики развития ДВС синдрома, что подтверждает существование порочного круга – «нетоз – повышенный уровень ИЛ-8» [30]. Важность наличия провоспалительного цитокинового фон как фактора, способствующего усиленному формированию ДНК-ловушек, показана и в экспериментальной работе J.J.R. Richardson и соавторов (2017 год) в группе пациентов с колоректальным раком, где проведено сравнение различных естественных и искусственных индукторов нетоза и

выявлена большая степень продукции НВЛ клетками пациентов при использовании провоспалительных цитокинов и ЛПС бактерий в сравнении с группой контроля.

Приведенный выше взгляд на полученные в результате исследования результаты подтверждает мысль о различном влиянии НВЛ как морфологического субстрата и нетоза как процесса на коагуляционный гемостаз и процесс фибринолиза, а также о различных биологических эффектах «прижизненного» и «смертельного» механизмов. Мы не получили состояния гиперкоагуляции в исследованных образцах плазмы, что, однако, не противоречит литературным данным, учитывая особенности экспериментальной модели, но при этом выявили ряд ассоциированных эффектов, не требующих присутствия в плазме НВЛ как таковой. Наиболее выраженный из них – активация системы фибринолиза и неспецифический протеолиз фибрина, а также выход провоспалительных цитокинов в зоне формирования ловушки.

Компоненты НВЛ способны оказывать не только тромbogenный эффект, реализуемый за счет контакта хроматина с факторами свертывания крови, тромбоцитами и эндотелием, но и фибринолитический, основанный на активации системы пламина и неспецифическим протеолизом фибрина, что вкупе с фагоцитозом тромбов другими лейкоцитами способствует реканализации сосудов после завершения реакций гемостаза. Однако, наличие злокачественного процесса значительно смещает баланс коагуляция-тромболизис в сторону фибринообразования за счет развития местного и системного воспалительного ответа, изменению пути формирования НВЛ и их количества и преобладанию прокоагулянтных эффектов вкДНК над фибринолитическим потенциалом протеаз НГ, что в сочетании с высоким уровнем ингибиторов фибринолиза, в конечном итоге, вносит свой вклад в формирование состояния хронической гиперкоагуляции, характерной для онкопатологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Гемостаз и иммунитет являются многокомпонентными и тонко сбалансированными системами в связи с чем, многие внешние воздействия и, развивающиеся в организме патологические процессы, способны сместить этот баланс в сторону неспецифических, но быстрых и универсальных защитных реакций – воспаления и гиперкоагуляции. Нетоз, при этом, выступает в роли связующего звена, объединяя врожденный иммунитет и активность системы гемостаза в единый комплекс защитных реакций. Широкая распространенность расстройств коагуляции, в особенности гиперкоагуляция, является отражением неблагоприятного состояния внутренней среды. В связи с этим неудивителен синергизм системы гемостаза и врожденного иммунитета в отношении любой потенциальной опасности, будь то инфекция или же асептическое повреждение. Сложностью, с медицинской точки зрения, является неспецифичность процесса нетоза, что делает его трудно поддающимся контролю. Многочисленные стимулы способны индуцировать НГ к нетозу и гарантировать его участие в любом воспалительном процессе независимо от этиологии. Биологическая целесообразность продукции ДНК-ловушек в местах развития гемостатических процессов заключается в создании максимально благоприятных условий для локализации возможной опасности, что очевидно и оправдано при микробной инвазии, но становится глобальной медицинской проблемой в случае отсутствия инфекционного агента [19, 20]. Давно известный факт накопления лейкоцитов в местах тромбообразования получил дополнительное объяснение после открытия явления нетоза, древнего и универсального способа защиты от проникновения чужеродных элементов. На этапе коагуляции и формирования тромба, НГ и НВЛ способны привлечь в данную зону и/или активировать больше участников

(главным образом тромбоцитов, лейкоцитов, эритроцитов, микровезикул), за счет механического накопления, а также межклеточных взаимодействий. Таким образом в зоне опасности создается максимальная концентрация защитных клеток и молекул. НВЛ со всем их агрессивным содержимым как структурный элемент постепенно включаются в состав тромба, что позволяет продолжать процесс элиминации патогенов при их наличии, в том числе в ситуации тромбоэмболии. После окончания гемостатических процессов, НВЛ и протеазы, включенные в тромб вместе с погибшими НГ, а также лейкоциты, покрывающие тромб со стороны просвета сосуда, осуществляют лизис сгустка. Плазмин при этом расщепляет главным образом фибрин, лейкоциты – разрушают и фагоцитируют тромб полностью, вместе с остатками клеток и возможными патогенами. НВЛ на данном этапе способствуют как активации плазменной системы фибринолиза, так и неспецифическому протеолизу фибрина. На основании этой логики мы полагаем, что НВЛ осуществляют вспомогательную функцию на этапе коагуляции, а также иммунное подкрепление тромбообразования, дальнейшая их роль в гемостатических реакциях заключается в элиминации тромбов, потенциально заключающих в себе патоген [27]. Литический и «прижизненный» механизмы нетоза определяют, соответственно, большую или меньшую протеазную активность НВЛ, что является компонентом патогенеза расстройств гемостаза при наличии острых и хронических воспалительных процессов.

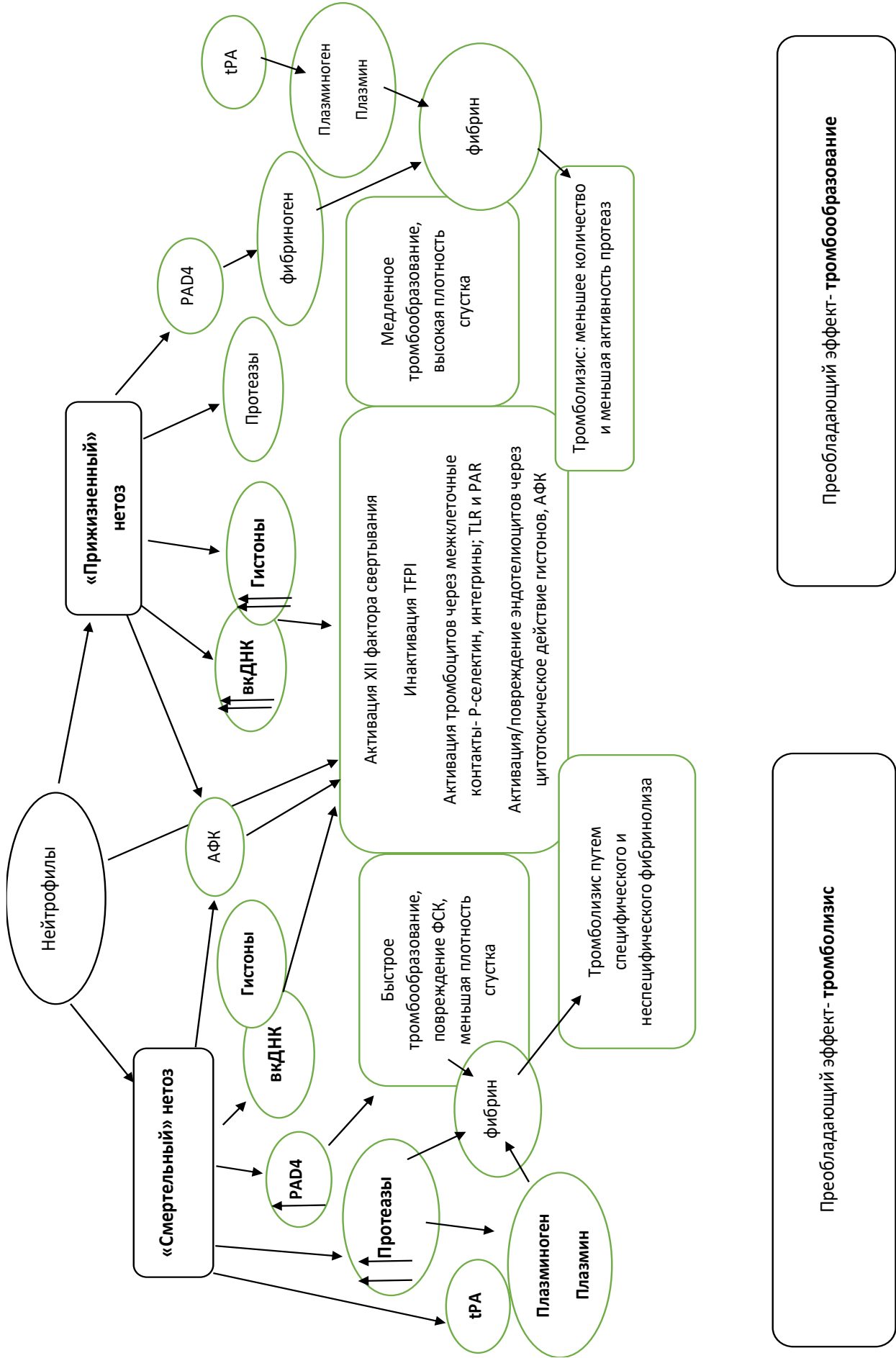


Рисунок 9. Патогенез нарушений фибринообразования и фибринолиза при "прижизненном" и "смертельном" нетозе

Выводы

1. Степень генерации нейтрофильных внеклеточных ловушек, индуцированная форбол-12-миристат-13-ацетатом, у больных раком толстого кишечника на 70% ниже в сравнении с лицами, не имеющими злокачественного процесса.
2. У пациентов с раком толстого кишечника и доноров, не имеющих злокачественного процесса, нейтрофильные внеклеточные ловушки, вызванные форбол-12-миристат-13-ацетатом, уменьшают начальную скорость коагуляции плазмы на 5,5%.
3. Формирование нейтрофильных внеклеточных ловушек сопровождается усилением активаторного и неспецифического протеолитического механизмов фибринолиза. Нейтрофилы пациентов с раком толстого кишечника, индуцированные к нетозу форбол-12-миристат-13-ацетатом, оказывают меньшее, чем у лиц, не имеющих злокачественного процесса, влияние на скорость tPA-зависимого фибринолиза, что выражается в сокращении на 10% и 30% соответственно, времени полного растворения фибринового сгустка.
4. Формирование нейтрофильных внеклеточных ловушек под действием форбол-12-миристат-13-ацетата у доноров сопровождается увеличением концентрации плазминогена/плазмина и снижением концентрации PAI-1 в плазме крови. У больных раком толстого кишечника нетоз не влияет на плазменный уровень плазминогена/плазмина и PAI-1.
5. Нетоз, вызванный форбол-12-миристат-13-ацетатом, у доноров и лиц со злокачественными новообразованиями толстого кишечника не изменяет плазменную концентрацию I, II, III, IX и XIII факторов свертывания крови и антитромбина- III.
6. Образование нейтрофильных внеклеточных ловушек у лиц, не имеющих злокачественного процесса, ведет к увеличению в плазме крови концентрации ИЛ-8 и PSGL-1, снижению – ИЛ-6. У пациентов с раком

толстого кишечника гибель нейтрофильных гранулоцитов путем нетоза не сопровождается изменением уровня указанных молекул.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдулкадыров К.М. Гематология / К.М. Абдулкадыров. – Москва : ЭКСМО ; Санкт-Петербург : Сова, 2004. – 928 с. – ISBN 5-699-05074-4.
2. Галкин А.А. Роль адгезии в активации нейтрофилов и цитотоксическом взаимодействии нейтрофилов с эндотелием / А.А. Галкин, В.С. Демидова // Успехи современной биологии. – 2011. – Т. 131. – № 1. – С. 62–78.
3. Гусакова Н.В. Нейтрофильные экстрацеллюлярные сети: биологическая роль, методы определения / Н.В. Гусакова, И.А. Новикова // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2014. – Т. 1. – № 9. – С. 96–104.
4. Долгушин И.И. Методы обнаружения нейтрофильных ловушек / И.И. Долгушин, Ю.С. Шишкова, А.Ю. Савочкина // Аллергология и иммунология. – 2009. – Т. 10. – С. 458–462.
5. Долгушин И.И. Нейтрофильные внеклеточные ловушки / И.И. Долгушин, Ю.С. Андреева, А.И. Рыжкова // Вестник новых медицинских технологий. – 2009. – Т. XVI, № 2. – С. 14.
6. Долгушин И.И. Секреторные функции нейтрофилов / И.И. Долгушин, А.Ю. Савочкина // Аллергология и иммунология. – 2015. – Т. 16. – № 2. – С. 210–212.
7. Зайчик А.Ш. Распознавание «своего» и взаимодействие со «своим» как основная форма активности адаптивной иммунной системы / А.Ш. Зайчик, А.Б. Полетаев, Л.П. Чурилов // Вестник Санкт-Петербургского университета. – 2013. – Вып. 1. – С. 6–27.
8. Защитные стратегии нейтрофильных гранулоцитов от патогенных бактерий / Б.Г. Андрюков, Л.М. Сомова, Е.И. Дробот, Е.В. Матосова // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2017. – № 1 (68). – С. 4–18.
9. Коротина О.Л. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: механизмы образования, функции / О.Л. Коротина, И.И. Генералов // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2012. – № 4. – С. 23–32.
10. Кузник Б.И. Взаимосвязи иммунитета и гемостаза в эксперименте и клинике // Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой

- хирургии : IV Всероссийская конференция / Б.И. Кузник. – Москва, 2009. – С. 267–269.
11. Кузник Б.И. Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии / Б.И. Кузник. – Чита : Экспресс-типография, 2010. – 832 с. – ISBN 978-5-9566-0253-9.
 12. Нейтрофильные гранулоциты: новый взгляд на “старых игроков” на иммунологическом поле / И.В. Нестерова, Н.В. Колесникова, Г.А. Чудилова [и др.] // Иммунология. – 2015. – Т. 36. – № 4. – С. 257–265.
 13. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм. Часть 1 / И.В. Нестерова, Н.В. Колесникова, Г.А. Чудилова, Л.В. Ломтатидзе // Инфекция и иммунитет. – 2017. – Т. 7. – № 3. – С. 219–230.
 14. Панченко Е.П. Новые возможности в лечении больных со стабильными проявлениями атеротромбоза // Кардиология. – 2017. – Т. 57. – № 12. – С. 82–89.
 15. Папаян Л.П. Новое в представлении процесса свертывания крови // Трансфузиология. – 2004. – Т. 5. – № 3. – С. 7–22.
 16. Папаян Л.П. Современные представления о механизме регуляции свертывания крови // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2003. – № 2. – С. 7–11.
 17. Паршина А.А. Влияние нетоз-ассоциированной нейтрофильной эластазы на процессы формирования и лизиса фибринового сгустка *in vitro* / А.А. Паршина, Н.Н. Цыбиков // Типовые патологические процессы: современные тренды в науке : Сборник трудов, посвященный 130-летию кафедры патофизиологии Императорского (государственного) Томского университета – Томского медицинского института – Сибирского государственного медицинского университета / под ред. члена-корреспондента РАН О.И. Уразовой. – Томск : Изд-во «Печатная мануфактура», 2020. – С. 99-100.
 18. Паршина А.А. / Влияние нейтрофильных внеклеточных ловушек на коагуляционный гемостаз и фибринолиз у пациентов со злокачественными

- новообразованиями толстого кишечника / А.А. Паршина, Н.Н. Цыбиков // Забайкальский медицинский вестник. – 2019. – № 4. – С. 90-96.
19. Паршина А.А. Нейтрофильные внеклеточные ловушки / А.А. Паршина, Н.Н. Цыбиков. – DOI 10.7868/S004213241805006X // Успехи современной биологии. – 2018. – Т. 138. – № 5. – С. 488-502.
20. Паршина А.А. Нейтрофильные внеклеточные ловушки как один из механизмов регуляции локального коагулологического потенциала / А.А. Паршина, Н.Н. Цыбиков // Актуальные проблемы клинической и экспериментальной медицины: материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 65-летию образования Читинской государственной медицинской академии. Под редакцией Н.В. Ларёвой. – Чита : РИЦ ЧГМА, 2018. – С. 190-191.
21. Пинегин Б.В. Нейтрофилы: структура и функция / Б.В. Пинегин, А.Н. Маянский // Иммунология. – 2007. – № 6. – С. 374–382.
22. Полетаев А.Б. Физиологическая иммунология: естественные аутоантитела и проблемы наномедицины / А.Б. Полетаев. – Москва : Миклош, 2010. – 218 с. – ISBN 978-5-91746-041-3.
23. Роль нейтрофильных гранулоцитов в иммуновоспалительном процессе / А.В. Москалёв, А.С. Рудой, А.В. Апчел, А.Б. Шангин // Вестник российской военно-медицинской академии. – 2016. – Т. 56. – № 4. – С. 191–195.
24. Струкова С.М. Тромбин регулятор процессов воспаления и репарации тканей // Биохимия. – 2001. – Т. 66. – № 1. – С. 14–27.
25. Типы иммуновоспалительных реакций как алгоритмы взаимодействия клеток в условиях репаративной регенерации и опухолевого роста / Л.А. Таширева, В.М. Перельмутер, В.Н. Манских [и др.] // Биохимия. – 2017. – № 82 (5). – С. 732–748.
26. Федоткина Ю.А. Тромбозы в онкологии. Часть 1 / Ю.А. Федоткина, Е.П. Панченко // Атеротромбоз. – 2017. – № 1. – С. 11–15.

27. A fibrin biofilm covers blood clots and protects from microbial invasion / F.L. Macrae, H. Herwald, R.A.S. Ariëns [et al.]. – DOI 10.1172/JCI98734 // *J Clin Invest.* – 2018. – Vol. 128 (8). – P. 3356–3368.
28. A myeloperoxidase-containing complex regulate Neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis / K.D. Metzler, C. Goosman, A. Lubojemska [et al.]. – DOI 10.1016/j.celrep.2014.06.044 // *Cell Reports.* – 2014. – Vol. 8. – P. 883–896.
29. A novel assay for neutrophil extracellular trap formation independently predicts disseminated intravascular coagulation and mortality in critically ill patients / S.T. Abrams, B. Morton, Y. Alhamdi [et al.]. – DOI 10.1164/rccm.201811-2111OC // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2019. – Vol. 200 (7). – P. 869–880.
30. A novel assay of neutrophil extracellular trap (NET) formation identifies anti-IL-8 therapies to reduce disseminated intravascular coagulation and mortality in the intensive care unit / S. Abrams, B. Morton, Y. Alhamdi [et al.]. – DOI 10.7861/clinmed.20-2-s114 // *Clinical Medicine.* – 2020. – Suppl 2. – P. s114–s115.
31. Actin and DNA protect histones from degradation by bacterial proteases but inhibit their antimicrobial activity / A. Sol, Y. Skvirsky, E. Blotnick [et al.]. – DOI 10.3389/fmicb.2016.01248 // *Front. Microbiol.* – 2016. – Vol. 7. – P. 1248.
32. Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death / A.K. Gupta, M.B. Joshi, M. Philippova [et al.]. – DOI 10.1016/j.febslet.2010.06.006 // *FEBS Lett.* – 2010. – Vol. 584. – P. 3193–3197.
33. Activation of conventional protein kinase C (PKC) is critical in the generation of human neutrophil extracellular traps / R.D. Gray, C.D. Lucas, A. Mackellar [et al.]. – DOI 10.1186/1476-9255-10-12 // *J Inflamm (Lond).* – 2013. – Vol. 10 (1). – P. 1.
34. Activation of PAD4 in NET formation / A.S. Rohrbach, D.J. Slade, P.R. Thompson, K.A. Mowen. – DOI 10.3389/fimmu.2012.00360 // *Front Immun.* – 2012. – Vol. 1. – № 3. – P. 360.

35. Activation of Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation / A. Hakkim, T. Fuchs, N. Martinez [et al.]. – DOI 10.1038/nchembio.496 // *Nature Chemical Biology*. – 2011. – Vol. 7. – P. 75–77.
36. Advances in the understanding of mitochondrial DNA as a pathogenic factor in inflammatory diseases / R.K. Boyapati, A. Tamborska, D.A. Doward, G.T. Ho. – DOI 10.12688/f1000research.10397.1 // *Research*. – 2017. – Vol. 6. – P. 169.
37. Aflatoxin B1 Induces Reactive Oxygen Species-Mediated Autophagy and Extracellular Trap Formation in Macrophages / Y. An, X. Shi, X. Tang [et al.]. – DOI 10.3389/fcimb.2017.00053 // *Front Cell Infect Microbiol*. – 2017. – Vol. 7. – P. 53.
38. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines / C. Schauler, C. Janko, L.E. Munoz [et al.]. – DOI 10.1038/nm.3547 // *Nature Medicine*. – 2014. – Vol. 20. – № 5. – P. 511–517.
39. Analysis of the potential of cancer cell lines to release tissue factor-containing microvesicles: correlation with tissue factor and PAR2 expression / C. Ettelaie, M.E.W. Collier, S. Feather [et al.]. – DOI 10.1186/s12959-016-0075-3 // *Thrombosis Journal*. – 2016. – Vol. 14. – P. 2.
40. APC inhibits neutrophil extracellular traps formation and activation in vivo / L.D. Healy, C. Puy, J.A. Fernandez [et al.]. – DOI 10.1074/jbc.M116.768309 // *J. Biol. Chem*. – 2017. – Vol. 292. – P. 8616–8629.
41. Aulik N.A. *Mannheimia haemolytica* and its leukotoxin cause macrophage extracellular trap formation by bovine macrophages / N.A. Aulik, K.M. Hellenbrand, C.J. Czuprynski. – DOI 10.1128/IAI.06120-11// *Infect. Immun*. – 2012. – Vol. 80. – P. 1923–1933.
42. Barnado A. At the bedside: neutrophil extracellular trap (NETs) as a target for biomarkers and therapies in autoimmune diseases / A. Barnado, L.J. Croford, J.C. Oates. – DOI 10.1189/jlb.5BT0615-234R // *J. Leuc. Biol*. – 2016. – Vol. 99. – P. 265–278.

43. Berezin A. Is the neutrophil extracellular trap-driven microvascular inflammation essential for diabetes vasculopathy? / A. Berezin. – DOI 10.7603/s40730-016-0021-9 // *Biomed Res Ther.* – 2016. – Vol. 3. – № 5. – P. 618–624.
44. Breuss J.M. VEGF-initiated angiogenesis and the uPA/uPAR system / J.M. Breuss, P. Uhrin. – DOI 10.4161/cam.22243 // *Cell Adhes Migr.* – 2012. – Vol. 6 (06). – P. 535–615.
45. Budnik I. Immune Factors in Deep Vein Thrombosis Initiation / I. Budnik, A. Brill. – DOI 10.1016/j.it.2018.04.010 // *Trends in Immunology.* – 2018. – Vol. 39 (8). – P. 610–623.
46. Cellular Mechanisms of NETosis Annu / H.R. Thiam, S.L. Wong, D.D. Wagner, C.M. Waterman. – DOI 10.1146/annurev-cellbio-020520-111016 // *Rev. Cell Dev. Biol.* – 2020. – Vol. 36. – P. 191–218.
47. Circulating levels of DNA-histone complex and dsDNA are independent prognostic factors of disseminated intravascular coagulation / J.E. Kim, N. Lee, J.-Y. Gu [et al.]. – DOI 10.1016/j.thromres.2015.03.014 // *Thrombosis Research.* – 2015. – Vol. 135. – P. 1064–1069.
48. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury / Q. Zhang, M. Raouf, Y. Chren [et al.]. – DOI 10.1038/nature08780 // *Nature.* – 2010. – Vol. 464. – № 7285. – P. 104–107.
49. Citrullination of fibrinogen by peptidylarginine deiminase 2 impairs fibrin clot structure / T. Damiana, D. Damgaard, J.J. Sidelmann [et al.]. – DOI 10.1016/j.cca.2019.10.033 // *Clinica chimica acta.* – 2020. – Vol. 501. – P. 6–11.
50. Clinical relevance of uPA, uPAR, PAI 1 and PAI 2 tissue expression and plasma PAI 1 level in colorectal carcinoma patients / J. Halamkova, I. Kiss, Z. Pavlovsky [et al.]. – DOI 10.5754/hge10232 // *Hepatogastroenterology.* – 2011. – Vol. 58 (112). – P. 1918–1925.
51. Cooperation Between the Inflammation and Coagulation Systems Promotes the Survival of Circulating Tumor Cells in Renal Cell Carcinoma Patients / W. Li, G. Liping, Z. Wen [et al.]. – DOI 10.3389/fonc.2019.00504 // *Frontiers in Oncology.* – 2019. – Vol. 9. – P. 504.

52. Cooperative PSGL-1 and CXCR2 signaling in neutrophils promotes deep vein thrombosis in mice / T. Yago, Z. Liu, J. Ahamed, R.P. McEver. – DOI 10.1182/blood-2018-05-850859 // *Blood*. – 2018. – Vol. 05. – P. 850859.
- 53.D (-) Lactic acid-induced adhesion of bovine neutrophils onto endothelial cells is dependent on neutrophil extracellular traps formation and CD11b expression / P. Alarcon, C. Manosalva, I. Conejeros [et al.]. – DOI 10.3389/fimmu.2017.00975 // *Front. Immun.* – 2017. – Vol. 8. – P. 975.
54. De Bont C.M. NETosis, complement, and coagulation: a triangular relationship / C.M. de Bont, W.C. Boelens, G.J.M. Pruijn. – DOI 10.1038/s41423-018-0024-0 // *Cell Mol Immunol.* – 2019. – Vol. 16. – P. 19–27.
55. Demers M. Neutrophil extracellular trap: A new link to cancer-associated thrombosis and potential implication for tumor progression / M. Demers, D.D. Wagner. – DOI 10.4161/onci.22946 // *Oncoimmunology*. – 2013. – Vol. 2. – P. e22946.
56. Distinct cell death programs in monocytes regulate innate responses following challenge with common causes of invasive bacterial disease / S.J. Webster, M. Daigneault, M.A. Bewley [et al.]. – DOI 10.4049/jimmunol.1000805 // *J. Immunol.* – 2010. – Vol. 185. – P. 2968–2979.
57. Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways / F.E. Kenny, A. Herzig, R. Kruger [et al.]. – DOI 10.7554/eLife.24437 // *eLife*. – 2017. – Vol. 6. – P. e24437.
58. DNA-bound elastase of neutrophil extracellular traps degrades plasminogen, reduces plasmin formation, and decreases fibrinolysis: proof of concept in septic shock plasma / D.B. da Cruz, J. Helms, L.R. Aquino [et al.]. – DOI 10.1096/fj.201901363RRR // *FASEBJ*. – Vol 33 (12). – P. 14270–14280.
59. DNase-1 Treatment Exerts Protective Effects in a Rat Model of Intestinal Ischemia-Reperfusion Injury / S. Wang, T. Xie, S. Sun [et al.]. – DOI 10.1038/s41598-018-36198-2 // *Scientific Reports*. – 2018. – Vol. 8 (1). – P. 17788.

60. Doring Y. Neutrophil extracellular traps in atherosclerosis and atherotrombosis / Y. Doring, O. Soehnlein, C. Weber. – DOI 10.1161/CIRCRESAHA.116.309692 // *Circ. Res.* – 2017. – Vol. 120. – P. 736–743.
61. Editorial: NETosis 2: Excitement continues / L.E. Munoz, M.J. Kaplan, M. Radic, M. Herrmann. – DOI 10.3389/fimmu.2017.01318 // *Front. Immun.* – 2017. – Vol. 8. – P. 1318.
62. Effects of Diabetes Mellitus on Fibrin Clot Structure and Mechanics in a Model of Acute Neutrophil Extracellular Traps (NETs) Formation / J.J. de Vries, T. Hoppenbrouwers, C. Martinez-Torres [et al.]. – DOI 10.3390/ijms21197107 // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21. – P. 7107.
63. Engelmann B. Extrasellular DNA and histones as thrombus stabilizer // *Thromb Haemos.* – 2015. – Vol. 113. – P. 1164–1165. DOI 10.1160/TH15-05-0375.
64. Eosinophils Regulate Interferon Alpha Production in Plasmacytoid Dendritic Cells Stimulated with Components of Neutrophil Extracellular Traps / J. Skrzeczynska-Moncznik, K. Zabieglo, J.P. Bossowski [et al.]. – DOI 10.1089/jir.2016.0036 // *J Interferon Cytokine Res.* – 2017. – Vol. 37. – № 3. – P. 119–128.
65. Evaluation of the effect of recombinant thrombomodulin on a lipopolysaccharide-induced murine sepsis model / K. Takehara, T. Murakami, K. Kuwahara-Arai [et al.]. – DOI 10.3892/etm.2017.4308 // *Experimental and Therapeutic Medicine.* – 2017. – Vol. 13. – P. 2969–2974.
66. Expression of functional tissue factor by neutrophil extracellular traps in culprit artery of acute myocardial infarction / D.A. Stakos, K. Kambas, T. Konstantinidis [et al.]. – DOI 10.1093/eurheartj/ehv007 // *Eur. Heart J.* – 2015. – Vol. 36. – P. 1405–1414.
67. Extracellular DNA: the tip of root defenses? / M.C. Hawes, G. Curlango-Rivera, F. Wen [et al.]. – DOI 10.1016/j.plantsci.2011.02.007 // *Plant Sci.* – 2011. – Vol. 180 (6). – P. 741–745.
68. Extracellular histones increase plasma thrombin generation by impairing thrombomodulin-dependent protein C activation / C.T. Ammollo, F. Semeraro, J.

- Xu [et al.]. – DOI 10.1111/j.1538-7836.2011.04422.x // J Thromb Haemost. – 2011. – Vol. 9. – P. 1795–1803.
69. Extracellular histones trigger disseminated intravascular coagulation by lytic cell death / W. Congqing, Y. Zhang, L. Li [et al.]. – DOI 10.1101/2020.06.11.144683 // Bio Rxiv preprint. – 2020. – Vol. 12. – P. 1–14.
70. Factor H Binds to Extracellular DNA Traps Released from Human Blood Monocytes in Response to *Candida albicans* / L.D. Halder, M.A. Abdelfatah, A.H. JoE. [et al.]. – DOI 10.3389/fimmu.2016.00671 // Front Immunol. – 2016. – Vol. 7. – P. 671.
71. Falanga A. Pathophysiology 1. Mechanisms of Thrombosis in Cancer Patients. Thrombosis and Hemostasis in Cancer. Eds G. Soff / A. Falanga, F. Schieppati, L. Russo. – DOI 10.1007/978-3-030-20315-3_2 // Cancer Treatment and Research. – 2019. – Vol. 179. – P. 11–36.
72. Fibrinolysis and Inflammation in Venous Thrombus Resolution / S. Mukhopadhyay, T.A. Johnson, N. Duru [et al.]. – DOI 10.3389/fimmu.2019.01348 // Front. Immunol. – 2019. – Vol. 10. – P. 1348.
73. Fibrinolysis and Thrombolysis / edited by K. Kolev. – 2014. – ISBN 978-953-51-1265-5. – URL: <https://www.intechopen.com/books/fibrinolysis-and-thrombolysis> (дата обращения: 15.05.2020).
74. First visualization of circulating neutrophil extracellular traps using cell fluorescence during human septic shock-induced disseminated intravascular coagulation / L. Stiela, C. Mayeur-Rousselet, J. Helmsa [et al.]. – DOI 10.1016/j.thromres.2019.09.036 // Thrombosis Research. – 2019. – Vol. 183. – P. 153–158.
75. Flow cytometric assay for quantification of neutrophil extracellular traps in blood samples / M. Gavillet, K. Martinod, R. Renella [et al.]. – DOI 10.1002/ajh.24185 // Am J Haematol. – 2015. – Vol. 90. – № 12. – P. 1155–1158.
76. Fuchs T. NET impact on deep vein thrombosis / T. Fuchs, A. Brill, D.D. Wagner. – DOI 10.1161/ATVBAHA.111.242859 // Atheroskler Thromb Vasc Biol. – 2012. – Vol. 3. – № 8. – P. 1777–1783.

77. Garley M. Heterogeneity among neutrophils / M. Garley, E. Jabłońska. – DOI 10.1007/s00005-017-0476-4 // Arch. Immun. Ther. Exp. – 2017. – Vol. 66 (1). – P. 21–30.
78. Gene expression during generation and activation of mouse neutrophils: Implication of novel functional and regulatory pathways / J.A. Ericson, P. Duffau, K. Yasuda [et al.]. – DOI 10.1371/journal.pone.0108553 // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9 (10). – P. e108553.
79. Goldmann O. The expanding world of extracellular traps: not only neutrophils but much more / O. Goldmann, E. Medina. – DOI 10.3389/fimmu.2012.00420 // Front. Immunol. – 2012. – Vol. 3. – P. 420.
80. Grover S.P. Neutrophils, NETs, and immunothrombosis / S.P. Grover, N. Mackman. – DOI 10.1182/blood-2018-08-868067 // Blood. – 2018. – Vol. 132. – P. 1360–1361.
81. Guglietta S. Coagulation induced C3aR-dependent NETosis drives protumorigenic neutrophils during small intestinal tumorigenesis / S. Guglietta, A. Chiavelli, E. Zagato. – DOI 10.1038/ncomms11037 // Nat. Comm. – 2015. – Vol. 7. – P. 1103.
82. Hasler P. Neutrophil extracellular traps in health and disease / P. Hasler, S. Giaglis, S. Hahn. – DOI 10.4414/smw.2016.14352 // Swiss Med Wkly. – 2016. – Vol. 146. – P. w14352.
83. Histone hypercitullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation / Y. Wang, M. Li, S. Stadler [et al.]. – DOI 10.1083/jcb.200806072 // J. Cell Biol. – 2009. – Vol. 184. – № 2. – P. 205–213.
84. Histones activate the NLRP3 inflammasome in Kupffer cells during sterile inflammatory liver injury / H. Huang, H.-W. Chen, J. Evankovich [et al.]. – DOI 10.4049/jimmunol.1202733 // J Immunol. – 2013. – Vol. 191. – № 5. – P. 2665–2679.
85. Hopke A. In vitro detection of neutrophil traps and post-attack cell wall changes in *Candida* hyphae / A. Hopke, R. Wheeler. – DOI 10.21769/BioProtoc.2213 // Bio Protoc. – 2017. – Vol. 7 (7). – P. 2213.

86. Human polymorphonuclear leukocytes produce and express functional tissue factor upon stimulation / N. Maugeri, M. Brambilla, M. Camera [et al.]. – DOI 10.1111/j.1538-7836.2006.01968.x // *J Thromb Haemost.* – 2006. – Vol. 4. – № 6. – P. 1323–1330.
87. IgA complexes in plasma and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis induce neutrophil extracellular traps via Fc α RI / E. Aleyd, M. Al, C.W. Tuk [et al.]. – DOI 10.4049/jimmunol.1502353 // *The Journal of Immunology.* – 2016. – Vol. 197. – P. 4552–4559.
88. Impaired Fibrinolysis in Patients with Isolated Aortic Stenosis is Associated with Enhanced Oxidative Stress / J. Siudut, J. Natorska, E. Wypasek [et al.]. – DOI 10.3390/jcm9062002 // *J. Clin. Med.* – 2020. – Vol. 9. – P. 2002.
89. In vitro activation of coagulation by human neutrophil DNA and histone proteins but not neutrophil extracellular traps / D.F. Noubouossie, M.W. Whelihan, Y-B. Yu [et al.]. – DOI 10.1182/blood-2016-06-722298 // *Blood.* – 2017. – Vol. 129. – № 8. – P. 1021–1029.
90. In vitro induction of NETosis: Comprehensive live imagine comparison and systematic review / T. Hoppenbrouwers, A.S.A. Autar, A.R. Sultan [et al.]. – DOI 10.1371/journal.pone.0176472 // *PLoS ONE.* – 2017. – Vol. 12. – № 5. – P. e0176472.
91. Infection and inflammation and the coagulation system / M. Levi, T.T. Keller, E. van Gorp, H. ten Cate. – DOI 10.1016/S0008-6363(02)00857-X // *Cardiovascular Research.* – 2003. – Vol. 60. – Issue 1. – P. 26–39.
92. Jorch S.K. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease / S.K. Jorch, P. Kubes. – DOI 10.1038/nm.4294 // *Nat Med.* – 2017. – Vol. 23. – P. 279–287.
93. Kazzaz N.M. Intercellular interactions as regulators of NETosis / N.M. Kazzaz, G. Sule, J.S. Knight. – DOI 10.3389/fimmu.2016.00453 // *Front. Immun.* – 2016. – Vol. 7. – P. 453.

94. Khan M.A. Transcriptional firing helps to drive NETosis / M.A. Khan, N. Palaniyar. – DOI 10.1038/srep4174 // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – P. 41749.
95. Khatua B. Sialic acids siglec interaction: A unique strategy to circumvent innate immune response by pathogens / B. Khatua, S. Roy, C. Mandal // *Indian J Med Res*. – 2013. – Vol. 138. – № 5. – P. 648–662.
96. Knight J.S. Proteins derived from neutrophil extracellular trap may serve as self-antigens and mediate organ damage in autoimmune diseases / J.S. Knight, C. Carmona-Rivera, M. Kapla. – DOI 10.3389/fimmu.2012.00380n // *Front. Immunol.* – 2012. – Vol. 3. – P. 380.
97. Kolev K. Editorial: Fibrinolysis in Immunity / K. Kolev, R.L. Medcalf. – DOI 10.3389/fimmu.2020.00582 // *Front. Immunol.* – 2020. – Vol. 11. – P. 582.
98. Komissarov A.A. Effects of extracellular DNA on plasminogen activation and fibrinolysis / A.A. Komissarov, G. Florova, S. Idell. – DOI 10.1074/jbc.M111.301218 // *J Biol Chem*. – 2011. – Vol. 286 (49). – P. 41949–41962.
99. Konig M.F. Reappraisal of Neutrophil Extracellular Traps and NETosis Mimics Based on Differential Requirements for Protein Citrullination / M.F. Konig, F.A. Andrade. – DOI 10.3389/fimmu.2016.00461 // *Frontiers in Immunology*. – 2016. – Vol. 7. – P. 461.
100. Kurup R. Neutrophils in acute coronary syndrome / R. Kurup, S. Patel // *EMJ Cardiol*. – 2017. – Vol. 5 (1). – P. 79–87.
101. Kuznik B. Immune mechanisms of the hemostatic system regulation / B. Kuznik, N. Tsybikov, Yu. Vitkovsky // *Thrombosis and Haemostasis*. – 1997. – № S. – P. 111.
102. Kwaan H. Fibrin and Fibrinolysis in Cancer / H. Kwaan, P. Lindholm. – DOI 10.1055/s-0039-1688495 // *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. – 2019. – Vol. 45 (04). – P. 413–422.

103. Lactoferrin suppresses neutrophil extracellular traps release in inflammation / K. Okubo, M. Kamiya, H. Nishi [et al.]. – DOI 10.1016/j.ebiom.2016.07.012 // EBioMedicine. – 2016. – Vol. 10. – P. 204–215.
104. Laridan E. Neutrophil Extracellular Traps in Arterial and Venous Thrombosis / E. Laridan, K. Martinod, S.F. De Meyer. – DOI 10.1055/s-0038-1677040 // Semin Thromb Hemost. – 2019. – Vol. 45 (01). – P. 086–093.
105. Leukocytes as a reservoir of circulating oncogenic DNA and regulatory targets of tumor-derived extracellular vesicles / S. Chennakrishnaiah, B. Meehan, E. D'Ast [et al.]. – DOI 10.1111/jth.14222 // J Thromb Haemost. – 2018. – Vol. 16. – P. 1800–1813.
106. Low-frequency electromagnetic field exposure enhances extracellular trap formation by human neutrophils through the NADPH pathway / L.A. Golbach, M.H. Scheer, J.J. Cuppen [et al.]. – DOI 10.1159/000380764 // J. Innate Immun. – 2015. – Vol. 7. – P. 459–465.
107. Maas C. Coagulation factor XII in thrombosis and inflammation / C. Maas, T. Renne. – DOI 10.1182/blood-2017-04-569111 // Blood. – 2018. – Vol. 131 (17). – P. 1903–1909.
108. Marsman G. Extracellular histones, cell-free DNA, or nucleosomes: differences in immunostimulation / G. Marsman, S. Zeerleder, B.M. Luken. – DOI 10.1038/cddis.2016.410 // Cell Death and Disease. – 2016. – Vol. 7. – P. e2518.
109. Measurement of NET formation in vitro and in vivo by flow cytometry / S. Masuda, S. Shimizu, J. Matsuo [et al.]. – DOI 10.1002/cyto.a.23169 // Cytometry Part A. – 2017. – Vol. 91A. – P. 822–829.
110. Mechanical stability and fibrinolytic resistance of clots containing fibrin, DNA, and histones / C. Longstaff, I. Varjú, P. Sótónyi [et al.]. – DOI 10.1074/jbc.M112.404301 // J Biol Chem. – 2013. – Vol. 288 (10). – P. 6946–6956.
111. Minasyan H. Blood coagulation: a powerful bactericidal mechanism of human innate immunity / H. Minasyan, F. Flachsbar. – DOI

- 10.1080/08830185.2018.1533009 // International Reviews of Immunology. – 2019. – Vol. 38. – Issue 1. – P. 3–17.
112. Miralda I. Multiple phenotypic changes define neutrophil priming / I. Miralda, S.M. Uriarte, K. McLeish. – DOI 10.3389/fcimb.2017.00217 // Front. Cell. Infect. Microbiol. – 2017. – Vol. 7. – P. 217.
113. Mitochondrial DNA neutrophil extracellular traps are formed after trauma and subsequent surgery / D.J. McIlroy, A.G. Jarnicki, G. Gough [et al.]. – DOI 10.1016/j.jcrc.2014.07.013 // Journal of critical care. – 2014. – Vol. 29. – P. 1133.e1–1133.e5.
114. Modulation of neutrophil NETosis: interplay between infection agents and underlying host physiology / S. Hahn, S. Giaglis, C.S. Chowdury [et al.]. – DOI 10.1007/s00281-013-0380-x // Semin Immunopatol. – 2013. – Vol. 35. – P. 439–453.
115. Monosodium urate crystals induce extracellular DNA trap in neutrophils, eosinophils, and basophils but not in mononuclear cells / C. Schorn, C. Janko, M. Latzko [et al.]. – DOI 10.3389/fimmu.2012.00277 // Front. Immun. – 2012. – Vol. 3. – P. 277.
116. Nakamura S. Tissue factor in neutrophil: yes / S. Nakamura, T. Imamura, K. Okamoto. – DOI 10.1111/j.1538-7836.2004.00548.x // J Thromb Haemost. – 2004. – Vol. 2. – P. 214–217.
117. Natural killer cells induce neutrophil extracellular trap formation in venous thrombosis / F.-R. Bertin, R.N. Rys, C. Mathieu [et al.]. – DOI 10.1111/jth.14339 // Journal of Thrombosis and Haemostasis. – 2018. – Vol. 17 (2). – P. 403–414.
118. Nauseef W.M. Pondering neutrophil extracellular traps (NETs) with healthy skepticism / W.M. Nauseef, P. Kubes. – DOI 10.1111/cmi.12652 // Cell Microbiol. – 2016. – Vol. 18 (10). – P. 1349–1357.
119. Neonatal NET-inhibitory factor and related peptides inhibit neutrophil extracellular trap formation / C.C. Yost, H. Schwertz, M.J. Cody [et al.]. – DOI 10.1172/JCI83873 // The Journal of Clinical Investigation. – 2016. – Vol. 126. – № 10. – P. 3783–3798.

120. NETs and cancer / J. Cedervall, A. Hamidi, A.K. Olsson Platelets. – DOI 10.1016/j.thromres.2018.01.049 // Thrombosis Research. – 2018. – Vol. 164. – P. 148–152.
121. NETs mitochondrial DNA its autoantibody in systemic lupus erythematosus and a proof-of-concept trial of metformin / H. Wang, T. Li, S. Chen [et al.]. – DOI 10.1002/art.39296 // Arthrit. Rheumatol. – 2015. – Vol. 67. – P. 3190–3200.
122. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis / K. Kessenbrock, M. Krumbholz, U. Schönemärck [et al.]. – DOI 10.1038/nm.1959 // Nat. Med. – 2009. – Vol. 15 (6). – P. 623–625.
123. Neutrophil cell death in response to infection and its relation to coagulation / T. Iba, N. Hashiguchi, I. Nagaoka [et al.]. – DOI 10.1186/2052-0492-1-13 // Journal of Intensive Care. – 2013. – Vol. 1. – P. 13.
124. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps / V. Papayannopoulos, K.D. Metzler, A. Hakkim, A. Zychlinsky. – DOI 10.1083/jcb.201006052 // J. Cell Biol. – 2010. – Vol. 191. – № 3. – P. 677–691.
125. Neutrophil elastase-deficient mice form neutrophil extracellular traps in an experimental model of deep vein thrombosis / K. Martinod, T. Witsch, K. Farley [et al.]. – DOI 10.1111/jth.13239 // J Thromb Haemost. – 2016. – Vol. 14. – P. 551–558.
126. Neutrophil extracellular trap components increase the expression of coagulation factors / A. de Los Reyes-García, A. Aroca, A.B. Arroyo. – DOI 10.3892/br.2019.1187 // Biomedical Reports. – 2019. – Vol. 10. – P. 195–201.
127. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans* / C.F. Urban, D. Ermet, C. Goosman [et al.]. – DOI 10.1371/journal.ppat.1000639 // PLoS Pathog. – 2009. – Vol. 5 (10). – P. e1000639.
128. Neutrophil extracellular trap formation and circulating nucleosomes in patient with chronic myeloproliferative neoplasms / C.P. Oyarzun, A. Carestia,

- P.R. Lev [et al.]. – DOI 10.1038/srep38738 // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6. – P. 38738.
129. Neutrophil extracellular trap in periodontitis: a web of intrigue / P.C. White, I.J. Chicca, P.R. Cooper [et al.]. – DOI 10.1177/0022034515609097 // *Journal of dental research*. – 2016. – Vol. 95. – № 1. – P. 26–34.
130. Neutrophil extracellular traps (NETs) in autoimmune diseases: A comprehensive review / K.H. Lee, A. Kronbichler, D.D.-Y. Park [et al.]. – DOI 10.1016/j.autrev.2017.09.012 // *Autoimmunity Reviews*. – 2017. – Vol. 16 (11). – P. 1160–1173.
131. Neutrophil extracellular traps induce organ damage during experimental and clinical sepsis / P.G. Czaikoski, J.M.S.C. Mota, D.C. Nascimento [et al.]. – DOI 10.1371/journal.pone.0148142 // *PLoS ONE*. – 2016. – Vol. 11 (2). – P. e148142.
132. Neutrophil extracellular traps induce trypsin activation, inflammation, and tissue damage in mice with severe acute pancreatitis / M. Merza, H. Hartman, M. Rahman [et al.]. – DOI 10.1053/j.gastro.2015.08.026 // *Gastroenterology*. – 2015. – Vol. 149. – P. 1920–1931.
133. Neutrophil extracellular traps kill bacteria / V. Brinkmann, U. Reichard, C. Goosmann [et al.]. – DOI 10.1126/science.1092385 // *Science*. – 2004. – Vol. 303 (5663). – P. 1532–1535.
134. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1 / T. Saitoh, J. Komano, Y. Saitoh [et al.]. – DOI 10.1016/j.chom.2012.05.015 // *Cell Host Microbe*. – 2012. – Vol. 12 (1). – P. 109–116.
135. Neutrophil extracellular traps produced during inflammation awaken dormant cancer cells in mice / J. Albregues, M.A. Shields, D. Ng [et al.]. – DOI 10.1126/science.aao4227 // *Science*. – 2018. – Vol. 361 (6409). – P. eaao4227.
136. Neutrophil extracellular traps promote peritoneal metastasis of colon cancer cells / A.A. Al-Haidari, N. Algethami, M. Lepsenyi [et al.]. – DOI 10.18632/oncotarget.26664 // *Oncotarget*. – 2019. – Vol. 10 (12). – P. 1238–1249.

137. Neutrophil extracellular traps promote thrombin generation through platelet-dependent and platelet-independent mechanisms / T.J. Gould, T.T. Vu, L.L. Swystun [et al.]. – DOI 10.1161/ATVBAHA.114.304114 // *Atheroskler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2014. – Vol. 34. – P. 1977–1984.
138. Neutrophil extracellular traps release induced by Leishmania: role of PI3K γ , ERK, PI3K σ , PKC, and [Ca²⁺] / T. DeSouza-Vieira, A. Guimarães-Costa, N.C. Rochael [et al.]. – DOI 10.1189/jlb.4A0615-261RR // *J Leukoc Biol.* – 2016. – Vol. 100. – № 4. – P. 801–810.
139. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus / R. Lande, D. Ganguly, V. Facchinetti [et al.]. – DOI 10.1126/scitranslmed.3001180. 2011 // *Sci. Transl. Med.* – 2011. – Vol. 3 (73). – P. 73ra19.
140. Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular trap / C.N. Jenne, C.H.Y. Wong, F.J. Zemp [et al.]. – DOI 10.1016/j.chom.2013.01.005 // *Cell Host Microbe.* – 2013. – Vol. 13. – P. 169–180.
141. Neutrophils sense microbial size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens / N. Branzk, A. Lubojemska, S.E. Hardison, Q. Wang. – DOI 10.1038/ni.2987 // *Nat Immunol.* – 2014. – Vol. 15. – № 11. – P. 1017–1025.
142. New aspects of the biology of neutrophil extracellular traps / D. Dabrowska, E. Jabłońska, M. Garley [et al.]. – DOI 10.1111/sji.12494 // *Scand. J. Immunol.* – 2016. – Vol. 84. – P. 317–322.
143. New criteria for sepsis-induced coagulopathy (SIC) following the revised sepsis definition: a retrospective analysis of nationwide survey / T. Iba, M. Di Nisio, J.H. Levy [et al.]. – DOI 10.1136/bmjopen-2017-017046 // *BMJ Open.* – 2017. – Vol. 7. – P. e017046.
144. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps / T.A. Fuchs, U. Abed, C. Goosmann [et al.]. – DOI 10.1083/jcb.200606027 // *J. Cell Biol.* – 2007. – Vol. 176 (2). – P. 231–241.

145. “On silico” peptide microarrays for high-resolution mapping of antibody epitopes and diverse protein-protein interactions / J.V. Price, S. Tangsombatvisit, G. Xu [et al.]. – DOI 10.1038/nm.2913 // *Nature medicine*. – 2012. – Vol. 18. – № 9. – P. 1434–1440.
146. PAD4 mediates histone hypercitrullination induces heterochromatin decondensation and chromatin unfolding to form neutrophil extracellular trap-like structures / M. Lechner, S. Wang, C. Lewis [et al.]. – DOI 10.3389/fimmu.2012.00307 // *Front. Immun.* – 2012. – Vol. 3. – Vol. 307.
147. Papayannopoulos V. Molecular mechanisms regulating NETosis in infection and disease / V. Papayannopoulos, N. Branzk. – DOI 10.1007/s00281-013-0384-6 // *Semin Immunopathol.* – 2013. – Vol. 35. – P. 513–530.
148. Peptidylarginine deiminase inhibitor suppresses neutrophil extracellular traps formation and MPO-ANCA production / Y. Kusunoki, D. Nakazawa, H. Shida [et al.]. – DOI 10.3389/fimmu.2016.00227 // *Front. Immun.* – 2016. – Vol. 7. – P. 227.
149. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation / M. Von Kockritz-Blickwede, O. Goldmann, P. Thulin [et al.]. – DOI 10.1182/blood-2007-07-104018 // *Blood*. – 2008. – Vol. 111. – P. 3070–3080.
150. Plasmacytoid dendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production / F.O. Nestle, C. Conrad, A. Tun-Kyi [et al.]. – DOI 10.1084/jem.20050500 // *J Exp Med*. – 2005. – Vol. 202. – № 1. – P. 135–143.
151. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood / S.R. Clark, A.C. Ma, S.A. Tavener [et al.]. – DOI 10.1038/nm1565 // *Nat Med*. – 2007. – Vol. 13. – № 4. – P. 463–469.
152. Platelets and neutrophils extracellular traps collaborate to promote intravascular coagulation during sepsis in mice / B. McDonald, R.P. Davis, S.-J. Kim [et al.]. – DOI 10.1182/blood-2016-09-741298 // *Blood*. – 2017. – Vol. 129. – № 10. – P. 1357–1367.

153. Priming of neutrophils toward netosis promotes tumor growth / M. Demers, S.L. Wong, K. Martinod [et al.]. – DOI 10.1080/2162402X.2015.1134073 // *Oncoimmunology*. – 2016. – Vol. 5. – P. e1134073.
154. Progression of head and neck cancer is associated with elevated neutrophil extracellular traps formation by circulating neutrophils / A.-S. Decker, E. Pylaeva, A. Brenzel [et al.]. – DOI 10.18416/CIO.2018.1810059 // *Proceedings on Cancer-Immuno-Oncology*. – 2018. – Vol. 1 (1). – P. 1810059.
155. Propagation of thrombosis by neutrophils and extracellular nucleosome networks / S. Pfeiler, K. Stark, S. Massberg, B. Engelmann. – DOI 10.3324/haematol.2016.142471 // *Haematologica*. – 2017. – Vol. 102 (2). – P. 206–213.
156. Prostaglandin E2 inhibits neutrophil extracellular trap formation through production of cyclic AMP / K. Shishikura, T. Horiuchi, N. Sakata [et al.]. – DOI 10.1111/bph.13373 // *British Journal of Pharmacology*. – 2016. – Vol. 173. – P. 319–331.
157. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases / S. Massberg, L. Grahl, M.-L. von Bruehl [et al.]. – DOI 10.1038/nm.2184 // *Nature Medicine*. – 2010. – Vol. 16. – № 8. – P. 887–897.
158. Recombinant human thrombomodulin inhibits neutrophil extracellular traps formation in vitro / Y. Shimomura, M. Suga, N. Kuriyama [et al.]. – DOI 10.1186/s40560-016-0177-9 // *Journal of Intensive Care*. – 2016. – Vol. 4. – P. 48.
159. Regulation of extracellular chromatin release from neutrophils / I. Neeli, N. Dwivedi, S. Khan, M. Radic. – DOI 10.1159/000206974 // *J. Innate Immun.* – 2009. – Vol. 1 (3). – P. 194–201.
160. Resistance of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* to both intracellular and extracellular killing of neutrophils / L. Wang, D. Shen, H. Wu, Y. Ma. – DOI 10.1371/journal.pone.0173638 // *PLoS ONE*. – 2017. – Vol. 12. – № 3. – P. e0173638.

161. Role of low-density neutrophils in human health and disease / S. Hassanpour, F.S. Lakschevitz, N. Fine [et al.] // *Trends in Cell & Molecular Biology*. – 2016. – Vol. 11. – P. 1–17.
162. Sanz-Moreno V. Mets and NETs: The Awakening Force / V. Sanz-Moreno, F.R. Balkwill. – DOI 10.1016/j.immuni.2018.11.009 // *Immunity*. – 2018. – Vol. 49 (5). – P. 798–800.
163. Schulz C. Demystifying the prothrombotic role of NETs / C. Schulz, S. Massberg. – DOI 10.1182/blood-2017-01-757328 // *Blood*. – 2017. – Vol. 129 (8). – P. 925–926.
164. Shaul M.E. Cancer-related circulating and tumor-associated neutrophils-subtypes, sources and function / M.E. Shaul, Z.G. Fridlender. – DOI 10.1111/febs.14524 // *FEBS J*. – 2018. – Vol. 285. – P. 4316–4342.
165. Signal inhibitory receptor on leukocytes-1 limits the formation of neutrophil extracellular traps, but preserves intracellular bacterial killing / K. Avondt, M. Linden, P.H. Naccache [et al.]. – DOI 10.4049/jimmunol.1501650 // *The Journal of Immunology*. – 2016. – Vol. 196. – P. 3686–3694.
166. Sorensen O.E. Neutrophil extracellular traps- the dark side of neutrophils / O.E. Sorensen, N. Borregaard. – DOI 10.1172/JCI84538 // *J Clin Invest*. – 2016. – Vol. 126. – № 5. – P. 1612–1620.
167. Spontaneous secretion of the citrullination enzyme PAD2 and cell surface exposure of PAD4 by neutrophils / Y. Zhou, B. Chen, N. Mittereder [et al.]. – DOI 10.3389/fimmu.2017.01200 // *Frontiers in immunology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 1200.
168. Stephan A. The NETs, the trap and the pathogen: neutrophil extracellular traps in cutaneous immunity / A. Stephan, M. Fabri. – DOI 10.1111/exd.12599 // *Exp. Dermatol*. – 2015. – Vol. 24. – P. 161–166.
169. The lymphocytes stimulation induced DNA release, a phenomenon similar to NETosis / A. Rocha, M. Rojas, G. Vasquez, J. Lopez-Scand. – DOI 10.1111/sji.12592 // *J. Immunol*. – 2017. – Vol. 86. – № 4. – P. 229–238.

170. The responses of macrophages in interaction with neutrophils that undergo NETosis / D. Nakazawa, H. Shida, Y. Kusunoki [et al.]. – DOI 10.1016/j.jaut.2015.08.018 // *Journal of Autoimmunity*. – 2016. – Vol. 67. – P. 19–28.
171. The time course of markers of neutrophil extracellular traps in patient undergoing revascularisation for acute myocardial infarction or stable angina pectoris / R. Helseth, S. Solheim, H. Arnesen [et al.]. – DOI 10.1155/2016/2182358 // *Mediators of Inflammation*. – 2016. – Vol. 2016. – P. 2182358.
172. Tranexamic acid modulates the immune response and reduces postsurgical infection rates / D.F. Draxler, K. Yep, G. Hanafi [et al.]. – DOI 10.1182/bloodadvances.2019000092 // *Blood Advances*. – 2019. – Vol. 3 (10). – P. 1598–1609.
173. Tumor-derived exosomes induce the formation of neutrophil traps: implications for the establishment of cancer-associated thrombosis / A.C. Leal, D.M. Mizurini, T. Gomes [et al.]. – DOI 10.1038/s41598-017-06893-7 // *Sci Rep*. – 2017. – Vol. 7. – P. 6438.
174. Varjú I. Networks that stop the flow: A fresh look at fibrin and neutrophil extracellular traps / I. Varjú, K. Kolev. – DOI 10.1016/j.thromres.2019.08.003 // *Thrombosis Research*. – 2019. – Vol. 182. – P. 1–11.
175. Wada T. Coagulofibrinolytic changes in patients with post-cardiac arrest syndrome // *Front. Med*. – 2017. – Vol. 4. – P. 156. DOI 10.3389/fmed.2017.00156
176. Yousef S. Does it really represent nature's "suicide bomber"? / S. Yousef, H.-U. Simon. – DOI 10.3389/fimmu.2016.00328 // *Front. Immun*. – 2016. – Vol. 7. – 328.
177. Yousefi S. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense / S. Yousefi, J.A Gold, N. Andina. – DOI 10.1038/nm.1855 // *Nat. Med*. – 2008. – Vol. 14. – P. 949–953.
178. Zucoloto A.Z. Platelet-Neutrophil Interplay: Insights Into Neutrophil Extracellular Trap (NET)-Driven Coagulation in Infection / A.Z. Zucoloto, C.N.

Jenne. – DOI 10.3389/fcvm.2019.00085 // *Frontiers in Cardiovascular Medicine*.
– 2019. – Vol. 6. – P. 85.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДФ	Аденозиндифосфат
АПК	Антигенпрезентирующая клетка
АФК	Активные формы кислорода
БАВ	Биологически активные вещества
БТаП	Бедная тромбоцитами аутоплазма
вкДНК	Внеклеточная ДНК
ДВС	Диссеминированное внутрисосудистое свертывание
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКаза	ДНК-эндонуклеаза
НАДФН	Никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный
НВЛ	Нейтрофильные внеклеточные ловушки
НГ	Нейтрофильные гранулоциты
нФП	Непрогретые фибриновые пластины
НЭ	Нейтрофильная эластаза
ПМЯЛ	Полиморфноядерные лейкоциты
пФП	Прогретые фибриновые пластины
РНК	Рибонуклеиновая кислота
СКВ	Системная красная волчанка
ТГВ	Тромбоз глубоких вен
ТФ	Тканевой фактор
ФБР	Фосфатный буферный раствор
ФМА	Форбол-12-миристат-13-ацетат
ФП	Фибриновые пластины
ФСК	Факторы свертывания крови
АТ-III	Антитромбин–III
CD	Кластер дифференцировки
CS	Размер фибринового сгустка
D	Плотность фибринового сгустка

DAMP	Ассоциированные с повреждением молекулярные паттерны
D	Плотность фибринового сгустка
ELISA	Иммуноферментный анализ
Fib	Фибриноген
GM-CSF	Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
HDN	Гранулоциты высокой плотности
IFN γ	Интерферон-гамма
IL-6	Интерлейкин-6
IL-8	Интерлейкин-8
LDN	Гранулоциты низкой плотности
LOT	Время начала лизиса фибринового сгустка
LP	Динамика лизиса фибринового сгустка
LTE	Время необходимое для полного лизиса фибринового сгустка
LTH	Лейкотоксическая гиперцитруллинация
MHC	Главный комплекс гистосовместимости
MP-CD142+	Микровезикулы, несущие тканевой фактор
MPO	Миелопероксидаза
NaCl	Хлорид натрия
NE	Нейтрофильная эластаза
NETs	Нейтрофильные внеклеточные ловушки
PAD4/PADI4	Пептидиларгининдеиминаза 4
PAF	Фактор, активирующий тромбоциты
PAI	Ингибитор активатора плазминогена
PAMP	Патоген-ассоциированные молекулярные паттерны
PLS	Плазминоген/плазмин
PMA	Форбол-12-миристан-13-ацетат

PMN-MDSC	Полиморфноядерные супрессорные клетки миелоидного происхождения
PPP	Плазма бедная тромбоцитами
PRR	Паттерн распознающие рецепторы
PS	P-селектин
PSGL-1	P-селектингликопротеинлиганд 1
PT	Протромбин
TAN	Опухоль ассоциированные нейтрофилы
TF	Тканевой фактор
TFPI	Ингибитор пути тканевого фактора
Th17	T- лимфоциты хелперы 17 типа
Tlag	Время задержки роста фибринового сгустка
TLR	Толл-подобные рецепторы
TNF α	Фактор некроза опухоли-альфа
tPA	Тканевой активатор плазминогена
Tsp	Время появления спонтанные сгустков
TxA ₂	Тромбоксан A ₂
uPA	Урокиназный активатор плазминогена
Vi	Скорость инициации роста фибринового сгустка
Vst	Стационарная скорость роста фибринового сгустка
VWF	Фактор фон Виллебранда
VII	Фактор свертывания крови VII (Проконвертин)
VIII	Фактор свертывания крови VIII (Антигемофильный глобулин)
IX	Фактор свертывания крови IX (Фактор Кристмаса)
X	Фактор свертывания крови X (Фактор Стюарта- Прауэра)
XII	Фактор свертывания крови XII (Фактор Хагемана)
XIII	Фактор свертывания крови XIII (Фибринстабилизирующий фактор)